

P20083322/A

UNIVERSITE DE LIMOGES



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2008

THESE N° 3322/A

**IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS
DANS LA MUCOVISCIDOSE:**

**EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA CARTE VITEK 2 GN (BIOMERIEUX)
ET**

**MISE EN EVIDENCE DU RISQUE DE CONFUSION DIAGNOSTIQUE DES
ESPECES *HERBASPIRILLUM HUTTIENSE* ET DU COMPLEXE *BURKHOLDERIA
CEPACIA* PAR LES TESTS PHENOTYPIQUES.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement
le 19 juin 2008 à Toulouse
par



Aurélie VEDRENNE
née le 8 septembre 1979, à Saint-Junien (87)

JURY

Mme le Professeur MC PLOY.....Président
M. le Professeur G. CHABANON.....Assesseur
M. le Professeur C. PASQUIER.....Assesseur
Mme. le Professeur C. ROQUES.....Assesseur
Mme Christine SEGONDS.....Directeur de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2008

THESE N° 3322

**IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS
DANS LA MUCOVISCIDOSE:**

**EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA CARTE VITEK 2 GN (BIOMERIEUX)
ET**

**MISE EN EVIDENCE DU RISQUE DE CONFUSION DIAGNOSTIQUE DES
ESPECES *HERBASPIRILLUM HUTTIENSE* ET DU COMPLEXE *BURKHOLDERIA
CEPACIA* PAR LES TESTS PHENOTYPIQUES.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement
le 19 juin 2008 à Toulouse
par

Auréli VEDRENNE
née le 8 septembre 1979, à Saint-Junien (87)

JURY

Mme le Professeur MC PLOY.....Président
M. le Professeur G. CHABANON.....Assesseur
M. le Professeur C. PASQUIER.....Assesseur
Mme. le Professeur C. ROQUES.....Assesseur
Mme Christine SEGONDS.....Directeur de thèse



UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

ASSESEURS

Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe

Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy

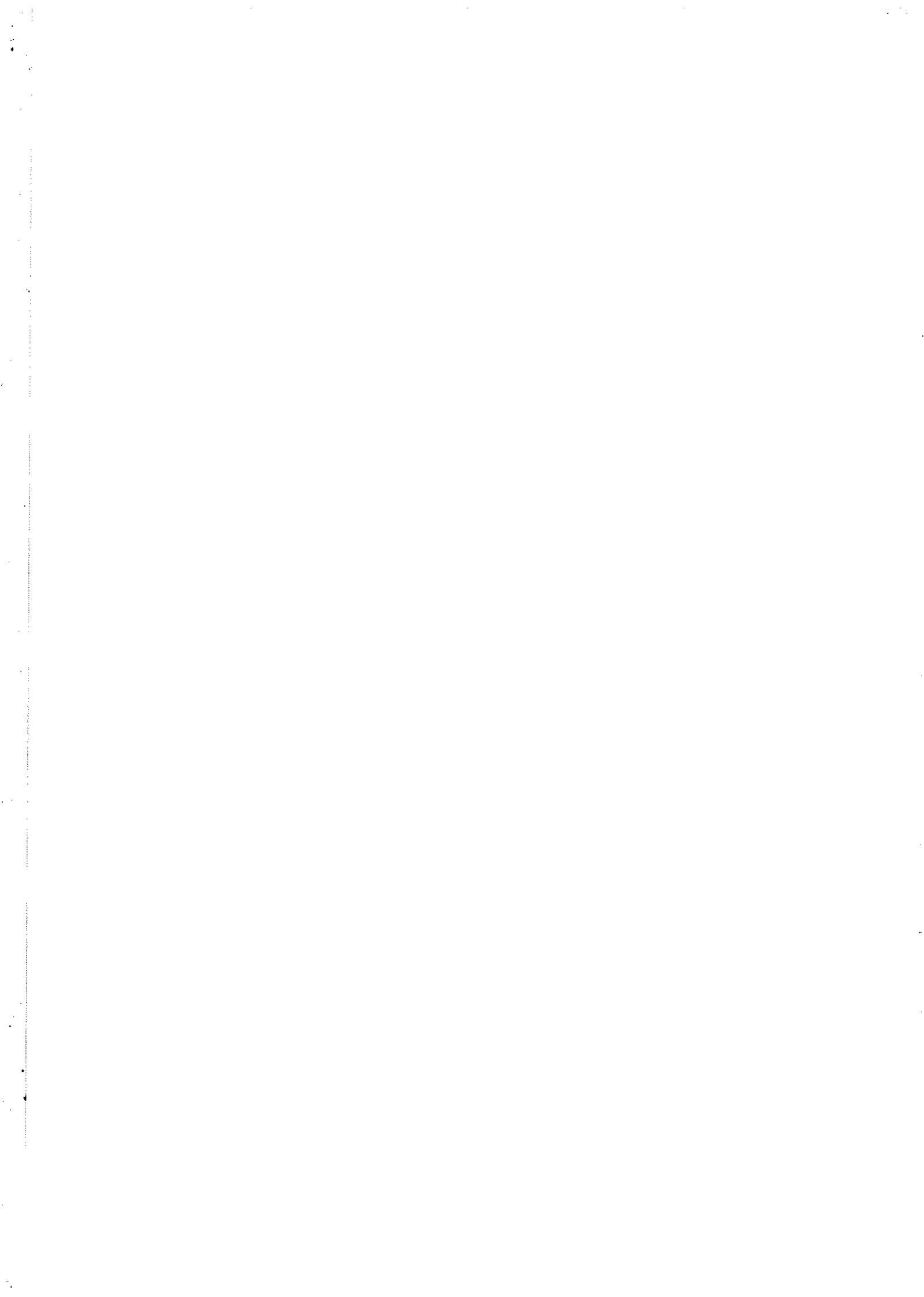
PHARMACOGNOSIE

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE



CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE (en disponibilité)
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
POUGET Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
ROUSSEAU Anniek	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel ANGLAIS

ATER A MI-TEMPS

GIRY Karine Sce Mme le Prof. CHULIA



REMERCIEMENTS

A notre Président de Jury,

Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy,

Professeur des Universités et praticien hospitalier en Bactériologie-Virologie-Hygiène au centre hospitalier et universitaire de Limoges,

Vous nous faites le grand honneur de présider notre jury de thèse, et vous avez bien voulu prendre sur votre temps pour examiner notre travail, qu'il nous soit permis de vous exprimer notre gratitude et notre profond respect.

A nos juges,

Monsieur le Professeur Gérard Chabanon,

Professeur des Universités et praticien hospitalier en Bactériologie-Hygiène au centre hospitalier et universitaire de Toulouse (Institut Fédératif de Biologie, Purpan),

Monsieur le Professeur Christophe Pasquier,

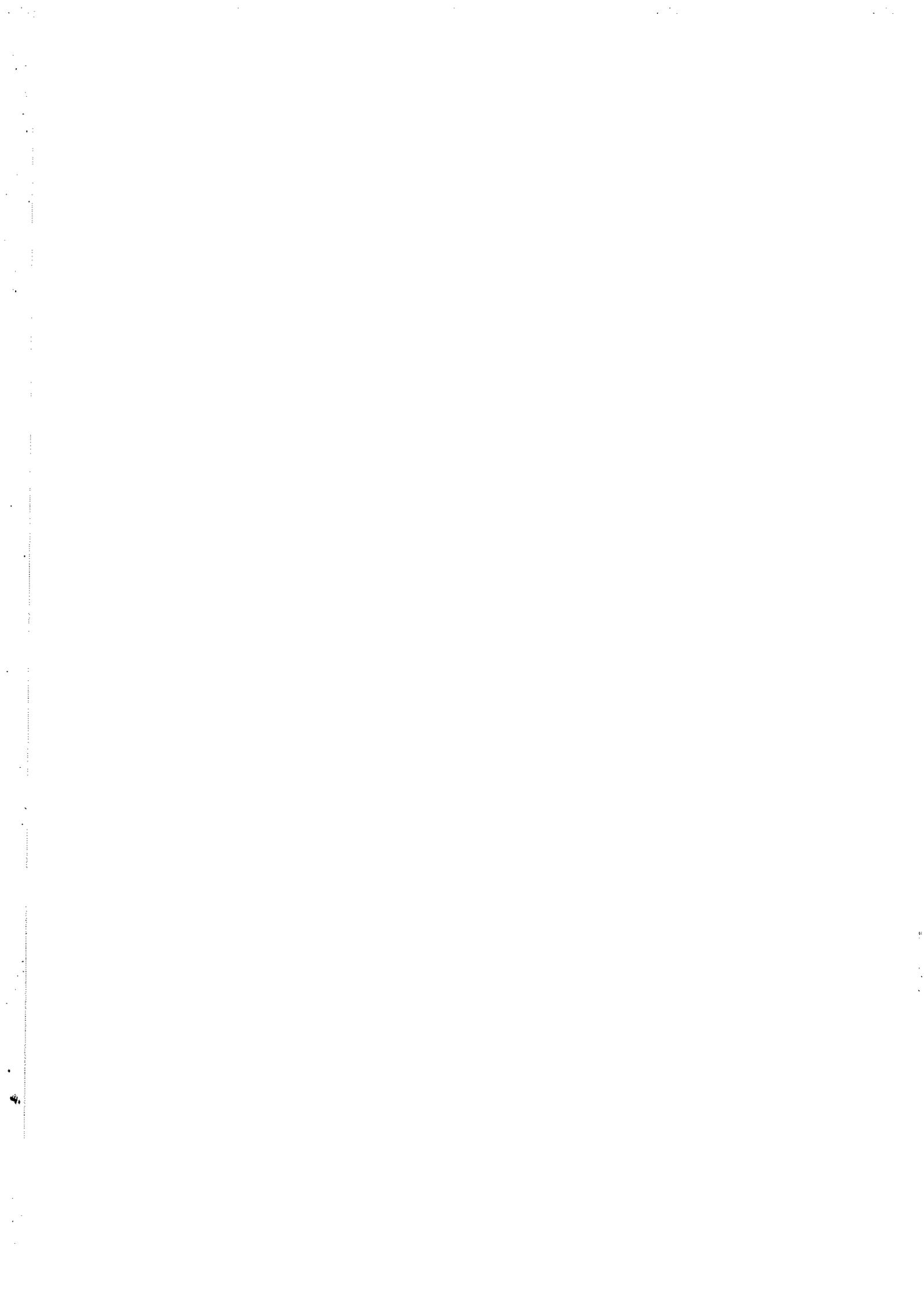
Professeur des Universités et praticien hospitalier en Virologie au centre hospitalier et universitaire de Toulouse (Institut Fédératif de Biologie Purpan),

Madame le Professeur Christine Roques,

Professeur des Universités à la faculté de pharmacie de Toulouse,

Nous vous sommes extrêmement reconnaissants de votre intérêt pour ce travail et d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Soyez assurés de notre immense gratitude.



A notre Directeur de thèse,

Mme Christine Segonds,

Praticien hospitalier, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Institut Fédératif de Biologie, hôpital Purpan, Toulouse

Je tiens à remercier particulièrement Madame Christine Segonds qui m'a confié cette thèse. Votre gentillesse, votre rigueur scientifique, vos précieux conseils et vos encouragements dans la réalisation de ce travail m'ont accompagnée tout au long de ce travail. Soyez assurée de mon immense reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame Bernadette Blanc (bioMérieux),

Merci de votre précieuse collaboration au cours de l'étude sur le Vitek 2.

A Madame le Docteur Jacqueline Carrère (Laboratoire de Biologie, Hôpital Renée Sabran, Giens), et Madame le Docteur Isabelle Pin (Département de Pédiatrie, Unité de Pneumologie infantile, CHU de Grenoble),

Soyez remerciées de m'avoir si gentiment transmis les données clinico-bactériologiques des patients colonisés à *H. huttienne*.

A Madame le Docteur Hélène Marchandin et Madame Estelle Jumas-Bilak (Laboratoire de Bactériologie, Centre hospitalier et universitaire de Montpellier),

Sans qui le séquençage des souches d'*Herbaspirillum* aurait été impossible.

Merci d'avoir accepté de réaliser ce travail.

A mes parents,

Vous m'avez communiqué le goût du travail et de la réussite sans lesquels je n'aurais pas réussi. Merci pour votre soutien sans faille, vos encouragements, votre écoute, autrement dit d'être là, tout simplement.

A mes sœurs et à Gabriel,

En espérant que vous serez fiers d'accueillir un Docteur dans la famille.

A mes Grands-parents,

Que ce travail vous remplisse de fierté.

A Denis,

et

à tous ceux qui me sont chers,

Sandra, Mylène, Laure G, Laure B, Anne-Laure, David, Muriel, Manue, Laurent, Quicky, Joël, que la vie continue à nous réunir, à Bordeaux, Toulouse, Paris ou Limoges, ou dans n'importe quel autre endroit du monde.

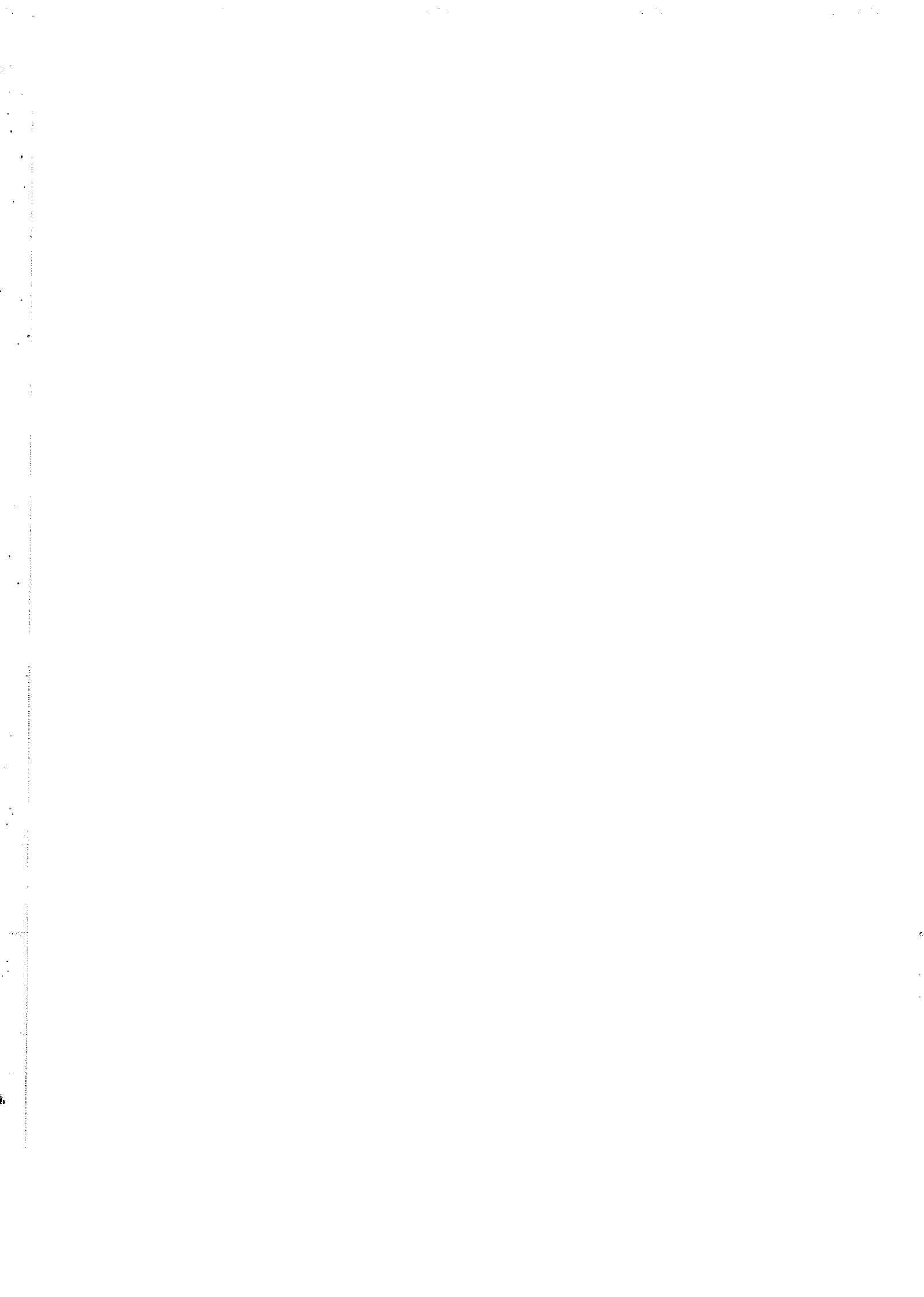


TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION	17
I. GENERALITES SUR LA MUCOVISCIDOSE	19
1- HISTORIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE	21
2- SEMIOLOGIE CLINIQUE	23
2.1. Manifestations digestives	23
2.1.1. Atteinte gastro-intestinale	23
2.1.2. Atteinte pancréatique exocrine	24
2.1.3. Manifestations hépatobiliaires	25
2.2. Manifestations respiratoires	27
2.2.1. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire	27
2.2.2. Présentation clinique : la bronchopathie chronique obstructive	28
2.2.3. Complications au cours de l'évolution	30
2.2.4. Aspects microbiologiques de l'atteinte pulmonaire	31
2.3. Atteinte de l'appareil génital	32
2.4. Manifestations ORL	33
2.5. Autres manifestations	33
3- EPIDEMIOLOGIE	35
4- GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE	39
4.1. Le gène CFTR	39
4.2. La protéine CFTR	39
4.2.1. Structure de la protéine CFTR	39
4.2.2. Expression de la protéine CFTR	40
4.2.3. Fonctions de la protéine CFTR	41
4.3. Les mutations du gène CFTR	44
5- DIAGNOSTIC	48
5.1. Test à la sueur	49
5.2. Mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal	51
5.3. Dépistage néonatal	51
5.4. Dépistage moléculaire	53

II. ASPECTS BACTERIOLOGIQUES DE L'ATTEINTE PULMONAIRE DANS LA MUCOVISCIDOSE	57
1- COLONISATION/INFECTION A STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET HAEMOPHILUS INFLUENZAE AU COURS DE LA MUCOVISCIDOSE	61
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	61
1.2. <i>Haemophilus influenzae</i>	63
2- IMPORTANCE DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS DANS LA MUCOVISCIDOSE	65
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	65
2.1.1. Epidémiologie	66
2.1.2. Facteurs de risques pour l'acquisition de PA	66
2.1.3. Origine de la contamination	66
2.1.4. Etapes de l'infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : primocolonisation, colonisation chronique, infection	68
2.1.5. Pourquoi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> joue-t-il un rôle prédominant dans la mucoviscidose?	70
a) Caractéristiques du poumon mucoviscidosique favorisant l'implantation et l'infection à PA	72
• Faible volume du liquide de surface de l'arbre respiratoire et défaillance de la clairance mucociliaire	72
• Une adhésion facilitée dans le poumon CF	72
• Une élimination défavorisée par le déficit fonctionnel de CFTR	73
• Défaillance de l'immunité naturelle	73
• Inefficacité de la réponse immune acquise	74
b) Caractéristiques de PA contribuant à l'infection initiale et à sa persistance	75
• Facteurs d'adhésion et de virulence de PA	76
• Conversion phénotypique des isolats et émergence de souches mucoïdes	78
• Variants à petites colonies	83
• Organisation en biofilm	84
• Avantages génétiques	86
• Sensibilité aux antibiotiques	87
2.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	88
2.2.1. Habitat et pouvoir pathogène	89
2.2.2. Epidémiologie de <i>S. maltophilia</i>	90
2.2.3. Facteurs de virulence	91
2.2.4. Diagnostic bactériologique	92
2.2.5. <i>S. maltophilia</i> : une espèce multirésistante aux antibiotiques	94
2.3. <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	95
2.3.1. Taxonomie	95
2.3.2. Caractéristiques bactériologiques	96
2.3.3. Pouvoir pathogène en dehors de la mucoviscidose et habitat	96
2.3.4. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> et mucoviscidose : prévalence, signification clinique, mode d'acquisition	96
2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques	99



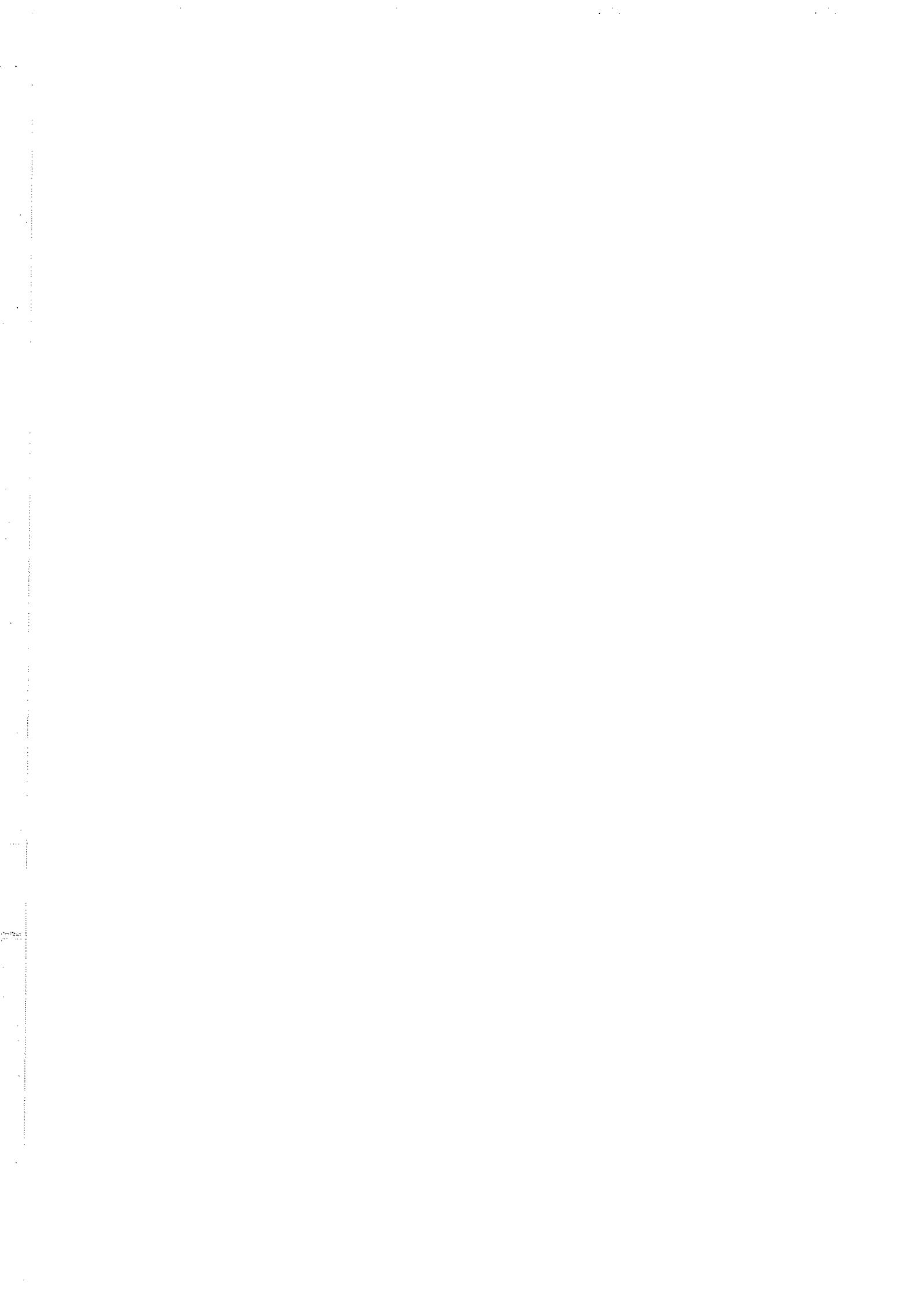
2.4.	Le complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	101
2.4.1.	Taxonomie du complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	102
2.4.2.	Habitat et pouvoir pathogène	104
2.4.3.	Mode d'acquisition des espèces du complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	106
2.4.4.	Epidémiologie	108
a)	Epidémiologie générale	108
b)	Distribution des clones de <i>B. cepacia</i> dans les communautés de patients atteints de mucoviscidose et mise en évidence de marqueurs potentiels de transmissibilité	110
2.4.5.	Structure génomique et principaux facteurs de virulence	112
2.4.6.	Diagnostic bactériologique	115
2.4.7.	Sensibilité aux antibiotiques	118
2.5.	Autres bacilles à Gram négatif non fermentants, présentant une résistance à la colistine, et pouvant poser des problèmes d'identification	119
2.5.1	<i>Burkholderia gladioli</i>	121
2.5.2.	Autres espèces du genre <i>Burkholderia</i>	122
2.5.3	Les espèces du genre <i>Ralstonia</i>	123
a)	Taxonomie du genre <i>Ralstonia</i>	123
b)	Caractéristiques bactériologiques	123
c)	Habitat et pouvoir pathogène	124
d)	Epidémiologie des genres <i>Ralstonia/Cupriavidus</i> dans la mucoviscidose	125
e)	Identification des espèces du genre <i>Ralstonia et Cupriavidus</i>	126
f)	Sensibilité aux antibiotiques	127
2.5.4.	Les espèces du genre <i>Pandoraea</i>	128
a)	Taxonomie du genre <i>Pandoraea</i>	128
b)	Caractères bactériologiques	129
c)	Habitat, rôle pathogène et épidémiologie	129
d)	Identification des espèces du genre <i>Pandoraea</i>	130
e)	Sensibilité aux antibiotiques	131
2.5.5.	Le genre <i>Inquilinus</i>	132
2.5.6.	Le genre <i>Chryseobacterium</i>	135
2.6.	Autres bacilles à Gram négatif non fermentants	137
3-	DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DE LA COLONISATION/INFECTION RESPIRATOIRE	138
3.1.	Modalités de prélèvement	138
3.2.	Examen cyto-bactériologique des expectorations	138
4-	DIFFICULTES D'IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS DANS LA MUCOVISCIDOSE	142
III.	EVALUATION DES PERFORMANCES DU SYSTEME VITEK2 POUR L'IDENTIFICATION DES GERMES GRAM- NON FERMENTANTS ISOLEES DE MUCOVISCIDOSE. (VITEK 2 GN – REF 21341)	149
1-	INTRODUCTION	151
2-	MATERIEL ET METHODES	152
2.1.	Souches bactériennes	152
2.2.	Identification des souches par la carte colorimétrique VITEK2 GN	153
2.3.	Identification des souches par les méthodes moléculaires (méthodes servant de référence)	154
3-	RESULTATS	156
4-	DISCUSSION ET CONCLUSION	165

IV. CONFUSION DIAGNOSTIQUE DES ESPECES <i>HERBASPIRILLUM HUTTIENSE</i> ET <i>BURKHOLDERIA COMPLEXE CEPACIA</i> PAR LES TESTS PHENOTYPIQUES : A PROPOS DE DEUX CAS.	173
1- INTRODUCTION	175
2- MATERIEL ET METHODES	176
2.1. Souches bactériennes	176
2.2. Tests phénotypiques	176
2.3. Antibiogrammes	177
2.4. Méthode moléculaire de référence (ARDRA)	177
2.5. Séquençage des souches	177
3. RESULTATS	178
3.1. Coloration de Gram	178
3.2. Résultats d'identification fournis par la galerie API20NE et la carte VITEK2GN	178
3.3. Résultats des antibiogrammes	181
3.4. Résultats des repiquages des souches sur les milieux sélectifs recommandés pour les prélèvements respiratoires issus de patients mucoviscidosiques	182
3.5. Identification des souches par la méthode moléculaire (ARDRA)	187
3.6. Séquençage des souches de <i>H. huttiense</i>	187
4- <i>Herbaspirillum huttiense</i> : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	188
5- <i>Herbasprillum huttiense</i> et mucoviscidose : description des cas cliniques.	189
5- DISCUSSION ET CONCLUSION	191
CONCLUSION	195
BIBLIOGRAPHIE	197
SERMENT DE GALIEN	219

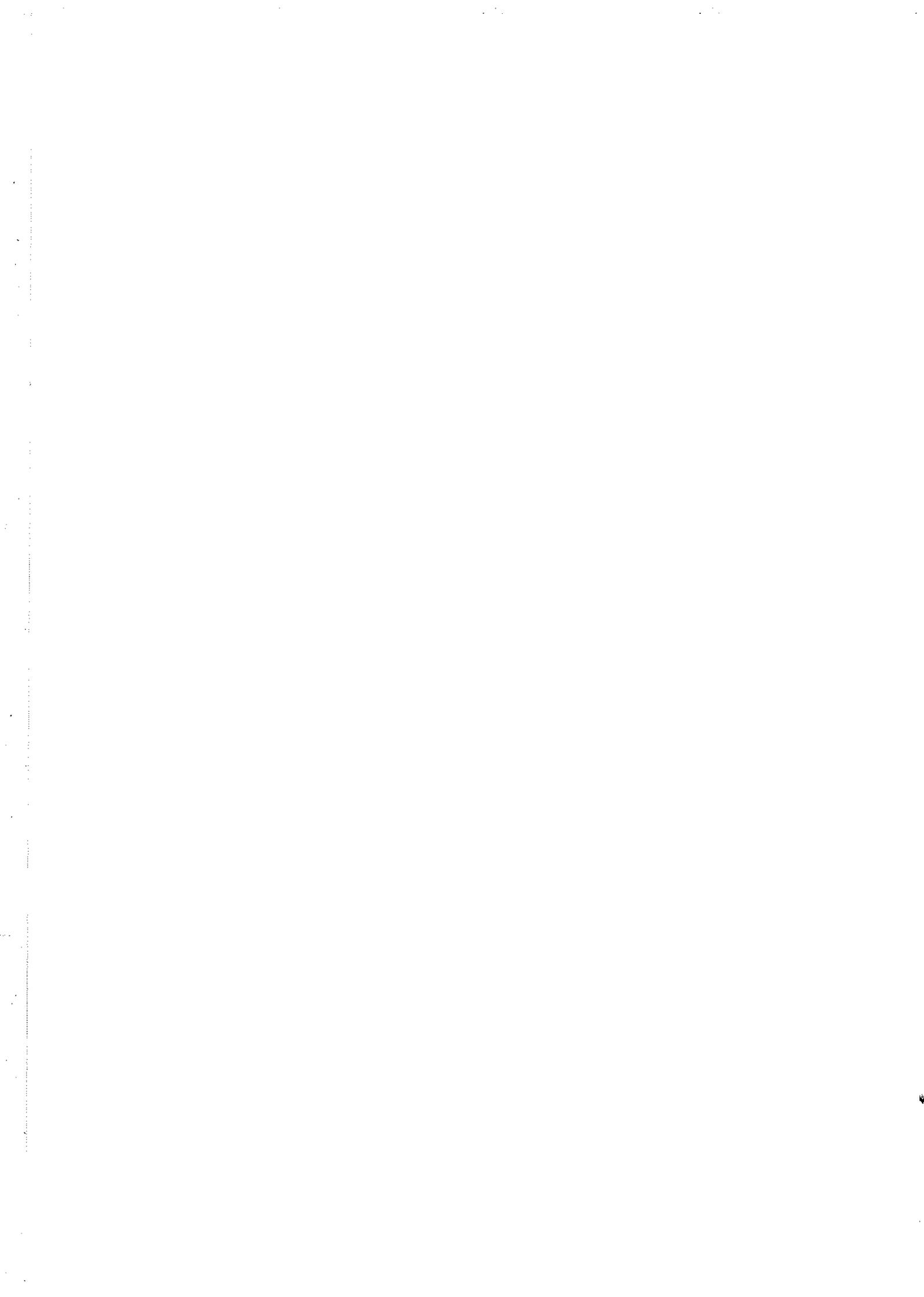
Liste des abréviations

ABC	ATP-binding cassette
acyl-HSL	Acyl-homosérine lactones
ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine diphosphate
A FDPHE	Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant
AFLM	Association française de lutte contre la mucoviscidose
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
a-GM1	Asialoganglioside-1
AMP	Adenosine monophosphate
AMPC	AMP cyclique
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARMS	Amplification refractory mutation system
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine tri phosphate
ATPase	Adénosine tri phosphatase
BCESM	<i>B. cepacia</i> epidemic strain marker
BcRLR	<i>Burkholderia cepacia</i> Research Laboratory and Repository
BGNNF	Bacilles à Gram négatif non fermentants
BPCO	Bronchopathie chronique obstructive
CBAVD	Congenital bilateral absence of vas deferens
CF	Cystic fibrosis
CFGAC	Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl-	Ions chlore
CRCM	Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
DDPTE	Différence de potentiel transépithélial
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DHPLC	Denaturing high performance liquid phase chromatography

Domaine R	Domaine régulateur
ECBC	Examen cyto bactériologique des crachats
ECF	Extra-Cytoplasmic Function
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENaC	Epithelial Na Channel
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR
EsmR	Epidemic strain marker regulator
ET12	Electrophorétype 12
ExoA	Exotoxine A
ExoS,T, U, Y	Exoenzyme S, T, U, Y
FAME	Fatty acid methyl esters
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
HET	Heteroduplex analysis
ICSI	Intra-cytoplasmic sperm injection
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IPE	Insuffisance pancréatique exocrine
IV	Intraveineux
K+	Ions potassium
LBA	Liquide de lavage broncho-alvéolaire
LDC	Lysine décarboxylase
LES	Liverpool Epidemic Strain
LPS	Lipopolysaccharide
MLST	Multilocus Sequence Typing
Na+	Ions sodium
NBF	Nucleotide Binding Fold
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF-kB	Nuclear factor-kappaB
NO	Oxyde nitrique
ODC	Ornithine décarboxylase
ONM	Observatoire National de la Mucoviscidose
ONPG	Ortho nitro phényl galactopyranoside
ORCC	Outwardly rectifying chloride channel
ORF	Open reading frame
ORL	Oto-rhino-laryngé

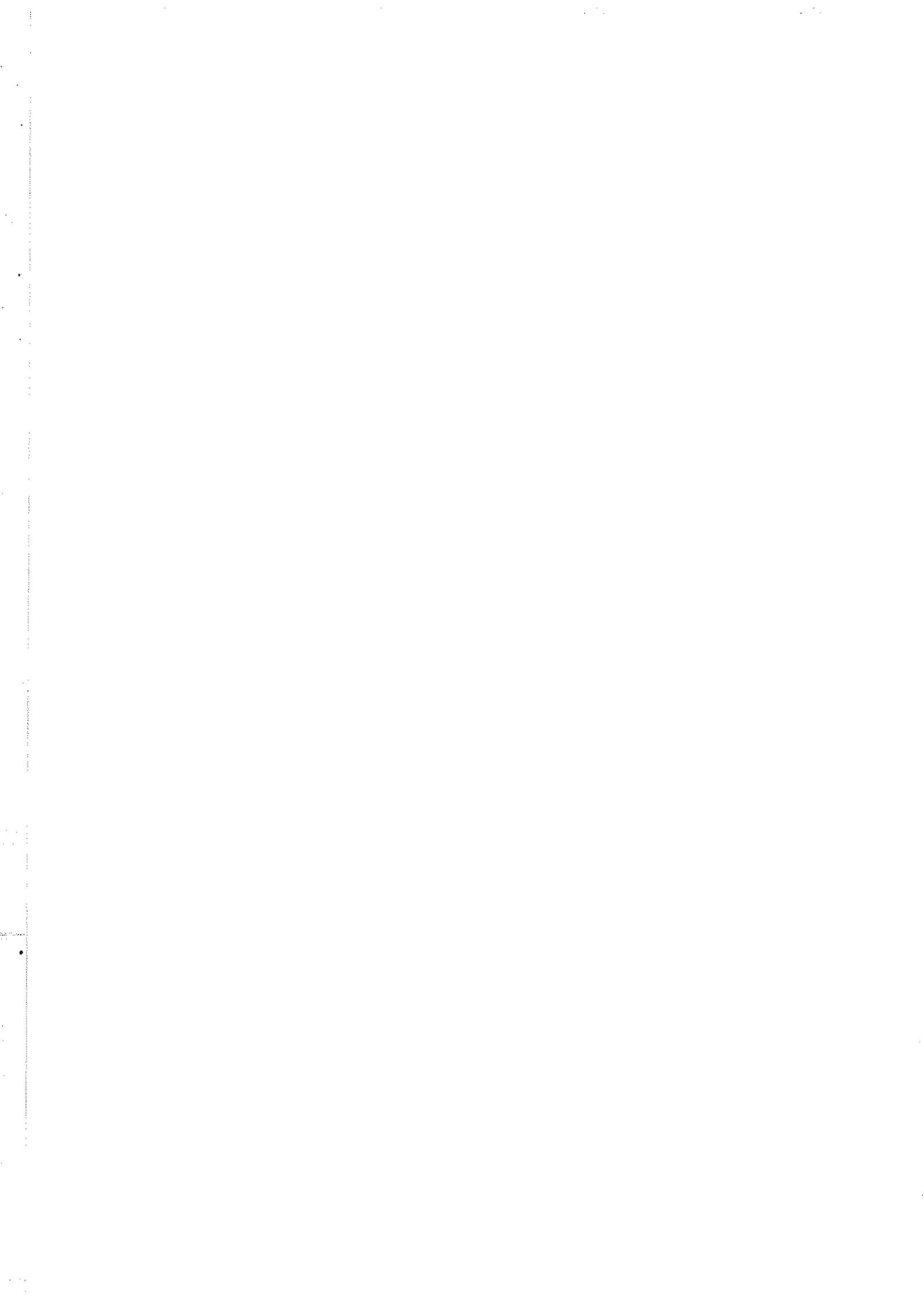


PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PNN	Polynucléaire neutrophile
PRM	Pattern recognition molecules
RAPD	Random Amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SCV	Small colony variant
SSCA	Single strand conformation analysis
ss-PCR	Species-specific PCR
TDM	Domaine transmembranaire
TIR	Trypsine immuno-réactive
TLR5	Toll-like receptor 5
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TTSS	Type III Secretion System
UFC	Unité formant colonie
VEMS	Volume expiré maximal par seconde
VLM	Vaincre la mucoviscidose



Liste des figures

Figure 1 : Carte de gauche : Localisation des patients selon le département de résidence (effectifs absolus). Carte de droite : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100000 habitants)	37
Figure 2 : Evolution de l'espérance de vie à la naissance et de la vie médiane entre 1994 et 2004.....	38
Figure 3 : Le gène <i>cftr</i> et la protéine CFTR	40
Figure 4 : Flux hydro-électrolytiques transépithéliaux.....	42
Figure 5 : Protocole du dépistage néonatal de la mucoviscidose.	53
Figure 6 : Prévalence de différents pathogènes lors d'infections pulmonaires chez des patients de différents âges atteints de mucoviscidose, en 2005.....	60
Figure 7 : Infection pulmonaire à <i>P. aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	68
Figure 8 : Rôle du défaut de la fonction CFTR et implication de <i>P. aeruginosa</i> dans la colonisation.	71
Figure 9 : Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	76
Figure 10 : Modèle proposé pour la production de l'alginate régulée par la protéine MucA	79
Figure 11 : Biosynthèse de l'alginate.	81
Figure 12 : Cycle de formation du biofilm bactérien chez <i>P. aeruginosa</i>	85
Figure 13 : Effets bénéfiques et néfastes des espèces du complexe <i>cepacia</i>	104
Figure 14: Structure génomique et principaux facteurs de virulence de <i>Burkholderia cenocepacia</i> ET12.....	113
Figure 15 : Susceptibilité aux antibiotiques de certains BGN non fermentants	146
Figure 16 : Résultats de PCR Exotoxine A obtenus avec 13 souches de <i>P. aeruginosa</i>	155
Figure 17 : Profils ARDRA de trois souches de <i>S. maltophilia</i> (souches 48, 49 50) et de la souche de référence LMG 13637	156
Figure 18 : Coloration de Gram de la souche 2.....	178
Figure 19 : Profil fourni par la carte VITEK 2 GN avec les trois souches de <i>H. huttiense</i>	180
Figure 20: Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d' <i>H. huttiense</i> sur milieux BCSA (BioMérieux) après 48 heures d'incubation, sauf pour la souche 1 (4 jours d'incubation).	183
Figure 21 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d' <i>H. huttiense</i> sur milieu OF après 48 heures d'incubation.	184
Figure 22 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d' <i>H. huttiense</i> sur milieu <i>cepacia</i> (AES) après 48 heures d'incubation.....	185
Figure 23 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d' <i>H. huttiense</i> sur milieu cétrimide après 48 heures d'incubation.	186
Figure 24 : Profil ARDRA des souches 1 (n°3 sur le gel) et LMG 2199 (souche n°5 sur le gel).....	187



Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs de référence de la concentration en chlorures dans la sueur	50
Tableau 2 : Les différentes espèces du complexe <i>cepacia</i>	103
Tableau 3 : Distribution des différentes espèces du complexe <i>cepacia</i> dans divers pays d'Europe et du monde.	109
Tableau 4: Principales caractéristiques phénotypiques permettant de différencier les bacilles à Gram négatif non fermentants résistants à la colistine et rencontrés au cours de la mucoviscidose.....	120
Tableau 5 : Milieux sélectifs recommandés pour l'isolement des germes dans les prélèvements respiratoires CF.	140
Tableau 6 : Souches étudiées.....	157
Tableau 7 : Evaluation des performances de la carte d'identification VITEK 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence sur 134 souches issues de patients mucoviscidosiques. ...	158
Tableau 8 : Evaluation des performances de la carte d'identification VITEK 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence sur 128 souches issues de patients mucoviscidosiques et appartenant à des espèces revendiquées par le VITEK 2.	158
Tableau 9 : Evaluations des performances de la carte Vitek 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence, en fonction de l'espèce ou du genre.....	160
Tableau 10 : Résultats des identifications concordantes avec les méthodes de référence, données par la carte VITEK 2 GN, en fonction de l'espèce ou du genre et de la probabilité de l'exactitude de l'identification.	161
Tableau 11 : Liste des erreurs d'identification et des faibles discriminations données par la carte VITEK 2 GN.	162
Tableau 12 : Durée (en heures) nécessaire à l'obtention de l'identification par la carte GN, en fonction de l'espèce ou du genre.	164
Tableau 13 : Evaluation des performances des cartes GNI, GNI+, et GNB pour l'identification des BGNNF.	166
Tableau 14 : Evaluation des performances des cartes VITEK GNI et VITEK 2 GNB pour l'identification de certaines espèces de BGNNF isolées de patients mucoviscidosiques.	167
Tableau 15: Comparaison des résultats d'évaluation des performances de la carte VITEK 2 GN de cette étude avec les études précédemment réalisées.....	168
Tableau 16 : Evaluation des performances de la carte VITEK 2 GN pour l'identification de <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. xylooxidans</i> , <i>S. maltophilia</i> , complexe <i>B. cepacia</i> et <i>R. mannitolilytica</i> selon les études précédentes et cette étude.	170
Tableau 17 : Résultats des tests fournis par la galerie API 20 NE pour les trois souches de <i>H. huttiense</i>	179
Tableau 18 : Antibiogrammes des trois souches de <i>H. huttiense</i>	181

INTRODUCTION

La mucoviscidose, ou cystic fibrosis (CF) selon la terminologie anglo-saxonne, est une maladie génétique, autosomale et récessive, liée à l'altération d'un seul gène, le gène *cftr* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). C'est une maladie polyviscérale qui atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines (rein, pancréas, intestin, coeur, vase déférent, foie, glandes sudoripares et voies respiratoires). Ces diverses atteintes résultent de l'altération des transports ioniques au sein de ces tissus, liée à l'absence ou au défaut de fonctionnalité de la protéine CFTR, qui joue le rôle de canal chlore.

La mucoviscidose constitue la maladie génétique létale la plus fréquente dans les populations caucasiennes avec une incidence en France évaluée à une naissance sur 4600 en 2005. Bien qu'il n'existe toujours pas de traitement curatif, les progrès médicaux réalisés dans la prise en charge de cette pathologie ont fait évoluer l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose de la petite enfance à 35-45 ans, avec une importante réduction de la mortalité infantile.

L'atteinte bronchopulmonaire, évoluant par poussées et conduisant à l'insuffisance respiratoire, constitue la principale cause de morbidité et de mortalité au cours de la mucoviscidose. L'augmentation de viscosité du mucus entraîne une occlusion progressive des voies respiratoires et crée un environnement propice aux infections bactériennes opportunistes. Les tissus respiratoires des malades CF sont rapidement et abondamment colonisés par des bactéries. Classiquement, trois germes pathogènes sont responsables de la plupart des épisodes de suppuration bronchique : *Staphylococcus aureus*, et *Haemophilus influenzae* qui apparaissent pendant l'enfance et *Pseudomonas aeruginosa* d'apparition plus tardive. L'infection chronique à *P. aeruginosa*, caractérisée par l'apparition de souches mucoïdes, constitue le problème infectieux principal et marque le plus souvent un tournant évolutif péjoratif de la maladie ; une fois l'infection bactérienne installée, il est très difficile, voire impossible, de l'éradiquer.

Cependant, en raison de la mise en œuvre de traitements antibiotiques divers, de l'augmentation de l'espérance de vie des patients CF et de l'amélioration des techniques de

diagnostic bactériologique, le spectre bactérien responsable des colonisations/infections pulmonaires dans la mucoviscidose, autrefois étroit, s'étoffe d'années en années. Ceci concerne notamment les bacilles à Gram négatif non fermentants, et il n'est désormais plus rare de mettre en évidence des espèces telles que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Burkholderia cepacia* dans les expectorations des patients CF.

D'autres espèces telles que *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea sp.*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.*, et *Chryseobacterium sp.* sont plus rarement rencontrées.

L'identification précise de l'espèce est indispensable car ces bactéries ont un pouvoir pathogène et une transmissibilité interhumaine variables, rendant importante leur identification au niveau de l'espèce pour la prise en charge des patients. Elle peut s'avérer difficile, ces espèces étant parfois proches sur le plan phénotypique et n'étant pas toujours incluses dans les bases de données des galeries biochimiques, et constitue un défi pour le laboratoire de Bactériologie médicale.

Après avoir exposé les principales caractéristiques de la mucoviscidose et les aspects bactériologiques de l'atteinte pulmonaire centrés sur la description des divers bacilles à Gram négatifs non fermentants retrouvés au cours de la mucoviscidose, nous exposerons les résultats de deux études réalisées au Laboratoire. La première consiste en une évaluation des performances de la carte colorimétrique VITEK 2 GN pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants issus de mucoviscidose. Dans la seconde étude, nous nous sommes intéressés au risque de confusion diagnostique de l'espèce *Herbaspirillum huttiense* avec les espèces du complexe *Burkholderia cepacia*, et nous avons réalisé la description bactériologique et clinique de deux cas de colonisation par *Herbaspirillum huttiense* chez des patients mucoviscidosiques.

I. GENERALITES SUR LA MUCOVISCIDOSE

1- HISTORIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE

La première description médicale précise de la mucoviscidose remonte à 1595. Elle a été faite par Pieter Paw, professeur d'anatomie et de botanique de Leiden (Pays-Bas) dans un ouvrage intitulé *Observationes Anatomicae Selectiores* : « J'ai procédé à l'autopsie d'une fillette de onze ans qu'on disait ensorcelée. (...) Le décès avait été causé par le pancréas, qui était particulièrement tuméfié ; il se trouvait tout près du renflement du foie, de telle sorte qu'on aurait pu croire, au toucher, qu'il s'agissait d'un squirre (sorte de cancer de consistance dure et ligneuse). (...) La fillette était décharnée, épuisée par une fièvre hectique (fièvre prolongée) ». Depuis, quelques observations ont été faites et rapportées au cours des siècles, évoquant d'autres cas de squirre du pancréas, des patients atrophiés, des écoulements de méconium dans la cavité abdominale, des occlusions intestinales, des prolapsus rectaux chez des enfants souffrant de diarrhée grave et prolongée [1].

Au XVII^{ème} siècle, des écrits parlant des symptômes de la mucoviscidose évoquent des "enfants au baiser salé" ce qui faisait penser qu'ils étaient ensorcelés, ou victimes de mauvais sorts, comme en témoigne l'adage du folklore populaire européen concernant "ces enfants maudits" : "Woe to that child which when kissed on the forehead tastes salt. He is bewitched and soon must die" [2].

La description de cette maladie, son diagnostic et sa prise en charge ne débutent réellement qu'au XX^{ème} siècle. La première description de la mucoviscidose, en tant qu'affection autonome, est réalisée en 1936 par le pédiatre suisse Guido Fanconi qui identifie l'association "fibrose kystique du pancréas et bronchectasies". En 1938, Dorothy Anderson donne la description anatomo-pathologique de la maladie. Elle démontre au cours de nombreuses autopsies d'enfants la différence existant avec la maladie coeliaque et fait la relation entre les modifications anatomiques observées et la symptomatologie clinique. L'atteinte et la destruction du pancréas sont quasi constantes, souvent associées à des lésions pulmonaires. L'observation de kystes et de tissus cicatriciels remplaçant la majorité du tissu pancréatique l'amène à nommer cette pathologie "cystic fibrosis of the pancreas". Plus tard, la maladie est décrite comme une exocrinopathie généralisée.

En 1944, Faber utilise le terme « mucoviscidosis » qui fait référence au mucus particulièrement épais : " muco " venant de mucus (glaires) " visci " dérive du mot visqueux (collant, insuffisamment fluide).

Les premières études sur le mode de transmission génétique débutent en 1946. L'analyse de la distribution familiale de la maladie permet d'émettre l'hypothèse d'une transmission autosomale récessive.

D'autres études sont alors réalisées, s'intéressant aux anomalies du mucus à l'origine de l'atteinte pulmonaire. Au cours de la vague de chaleur qui atteint New York en 1948, un jeune pédiatre, Paul di Sant'Agnes, attribue le décès d'une douzaine d'enfants atteints à une perte de sel. Il suspecte alors une anomalie de la sueur et met en évidence un excès de chlorure de sodium dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose [3,4].

Cette découverte conduira peu après à la mise au point du « test à la sueur » utilisant l'iontophorèse à la pilocarpine de Gibson-Cooke (1959) qui mesure la concentration en sodium dans la sueur [5].

Dans les années 1980, l'anomalie du transport de sel est précisée par Quinton qui décrit le défaut de perméabilité aux ions chlorures affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares, et par Knowles et col. qui observent le même phénomène au niveau de l'épithélium respiratoire [6].

En 1989, l'anomalie génétique à l'origine de la maladie, correspondant à une mutation d'un gène situé sur le bras long du chromosome 7, est identifiée grâce aux efforts conjugués de multiples chercheurs dont Lap-Chee Tsui et John R. Riordan. Ce gène code une protéine appelée Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) qui assure le transport du chlore à travers la membrane des cellules épithéliales (bronches, canaux pancréatiques et hépatiques, canaux déférents et glandes sudoripares) [7,8]. Ultérieurement, de très nombreuses mutations (plus de 1000) sont reconnues et réparties en 6 classes.

Les progrès accomplis dans la compréhension de la physiopathologie de la mucoviscidose ont permis d'élaborer une stratégie de prise en charge de plus en plus performante. Les premiers traitements sont mis en œuvre dans les années 1940 et des centres de prise en charge spécifiques apparaissent dans les années 1950. Le développement des thérapeutiques est alors constant, faisant appel à la kinésithérapie, l'antibiothérapie, l'opothérapie substitutive, et la transplantation et permettant d'améliorer considérablement l'espérance de vie des personnes atteintes qui est passée de quelques années en 1940 à plus de 42 ans en 2004.

2- SEMIOLOGIE CLINIQUE

La présentation clinique de la mucoviscidose est très polymorphe, l'âge d'apparition des symptômes ainsi que la gravité de la maladie sont très variables. Le tableau clinique classique associe une atteinte pulmonaire, digestive, et ORL ainsi qu'une infertilité masculine. Cependant, chez certains patients, un organe est préférentiellement atteint (formes pulmonaires ou formes digestives) ; enfin, des formes atténuées sont observées (par exemple une simple infertilité masculine par agénésie bilatérale des canaux déférents).

2.1. Manifestations digestives

L'atteinte digestive de la mucoviscidose est polymorphe, touchant le tube digestif proprement dit, mais aussi le pancréas, le foie et les voies biliaires [9].

2.1.1. Atteinte gastro-intestinale

L'iléus méconial est une occlusion aiguë néonatale par le méconium insuffisamment liquéfié du fait d'une sécrétion protéolytique insuffisante par le pancréas et les glandes intestinales. Il constitue la manifestation initiale de la maladie dans 10 à 15 % des cas. L'occlusion siège en général au niveau de l'iléon terminal avec apparition à la 48^{ième} heure de vomissements, de ballonnements sans émission de méconium. Dans la moitié des cas environ, cette occlusion est simple et peut être levée médicalement par des traitements évacuateurs utilisant des produits hyperosmolaires et fluidifiants. Dans l'autre moitié des cas, elle se complique de volvulus du grêle, d'atrésie iléale ou de péritonite méconiale par perforation imposant un recours à la chirurgie (résection plus ou moins importante avec anastomose terminale). Parfois, il s'agit d'un simple retard à l'évacuation du méconium. L'iléus méconial peut être suspecté lors de l'échographie morphologique par l'existence d'une hyperéchogénicité intestinale.

En dehors de la période néonatale, une occlusion de même nature peut survenir réalisant une obstruction intestinale distale : l'iléus stercoral qui peut se compliquer d'invagination intestinale aiguë. La fréquence du syndrome d'obstruction intestinale distale chez l'adolescent et l'adulte est de l'ordre de 20%.

Le prolapsus rectal, rare chez l'enfant, est toujours évocateur et justifie la réalisation d'un test à la sueur.

Un reflux gastro-oesophagien apparaît chez 25% des patients et touche 80% des adultes. Il constitue une complication de la bronchopneumopathie chronique. Gastrite et duodénite peuvent également se voir.

Des complications intestinales, telles qu'une constipation ou des pathologies appendiculaires (appendicite, mucocèle appendiculaire déterminé par une obstruction de la lumière appendiculaire par du mucus), peuvent également être rencontrées.

Certaines pathologies intestinales présentent un risque d'apparition plus élevé chez les patients atteints de mucoviscidose que dans la population générale, c'est le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolique hémorragique), de la maladie coeliaque et de l'intolérance aux protéines du lait de vache.

Une étude prospective sur 10 ans a montré une incidence plus élevée de cancers digestifs (intestin grêle, colon et voies biliaires) chez les adultes atteints de mucoviscidose et en particulier chez les patients transplantés [10].

2.1.2. Atteinte pancréatique exocrine [11]

L'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) est une des manifestations cardinales de la mucoviscidose. Cependant, elle est le plus souvent au second plan derrière les manifestations pulmonaires qu'elle peut malgré tout contribuer à aggraver.

Retrouvée chez environ 80 à 90% des patients, elle est responsable d'une diarrhée chronique avec émission de selles volumineuses, grasses et nauséabondes. Cette diarrhée, due à une maldigestion des graisses et des protéines, est responsable d'une hypotrophie pondérale puis staturale, qui contraste chez le nourrisson avec un appétit conservé (en dehors des épisodes d'infections respiratoires). Secondairement, compte tenu des infections répétées et de l'atteinte respiratoire, l'appétit diminue, accentuant les troubles de croissance staturo-pondérale et conduisant à une véritable dénutrition. La maldigestion s'accompagne de carences secondaires en vitamines liposolubles A, D, E, et K et en oligoéléments. En revanche, chez 10 % à 15% des malades, la sécrétion pancréatique est suffisante pour subvenir aux besoins digestifs.

La mucoviscidose est la première cause d'IPE avant l'âge de 30 ans. Plusieurs études ont montré l'association étroite entre le génotype CFTR et l'IPE. Au sein d'une même famille, le statut vis-à-vis de la sécrétion pancréatique est toujours le même avec des familles de suffisants et des familles d'insuffisants pancréatiques exocrines.

Dès la vie anténatale, il y a accumulation de bouchons muqueux au niveau des canaux pancréatiques aboutissant à une obstruction canalaire proximale et des lésions de dégénérescence du tissu pancréatique avec atrophie des acini puis transformation graisseuse du pancréas. Les îlots de Langherans restent longtemps épargnés [9]. Le dysfonctionnement pancréatique est perceptible *in utero* puisque le taux d'enzymes pancréatiques dans le liquide amniotique est abaissé par rapport à celui des fœtus non atteints. Chez la moitié des enfants, la fonction pancréatique exocrine reste dans les valeurs de la normale jusqu'à l'âge de 4 mois et à la fin de la première année de vie, près de 90 % des enfants ayant une mucoviscidose ont une insuffisance pancréatique exocrine.

Pendant le premier semestre de la vie, la concentration de trypsine immunoréactive sérique est en général plus élevée que la normale, puis elle chute à un niveau indécélable. Le dosage de cette enzyme est donc utilisé pour le dépistage néonatal réalisé à J3.

La fibrose pancréatique peut s'étendre aux îlots de Langherans produisant une insuffisance pancréatique endocrine. Celle-ci est retrouvée chez 30 % à 50 % des malades dont 1 % à 2 % requièrent une insulinothérapie.

Des poussées de pancréatite aiguë peuvent également survenir.

2.1.3. Manifestations hépatobiliaires

L'atteinte hépatobiliaire avec apparition d'une cirrhose hépatique est décrite comme une complication de la mucoviscidose depuis 1938 mais, jusqu'à ces dernières années, son importance semblait secondaire par rapport à la gravité de l'atteinte respiratoire et, à un degré moindre, à celle de l'atteinte pancréatique. Parallèlement à l'accroissement de l'espérance de vie lié à l'amélioration des traitements, les manifestations hépatobiliaires de la mucoviscidose sont devenues plus fréquentes. L'atteinte hépato-biliaire de la mucoviscidose se traduit par une élévation de la viscosité de la bile, des obstructions à l'évacuation de cette dernière dans les canaux hépatiques vers la vésicule biliaire, et une cirrhose biliaire multifocale.

- **Manifestations hépatiques**

Les données concernant la prévalence et l'incidence de l'atteinte hépatique au cours de la mucoviscidose sont nombreuses mais souvent hétérogènes selon les critères de diagnostic retenus : cliniques, échographiques, biologiques, ou même autopsiques.

L'incidence de la stéatose du foie est estimée à 4 %, celle de la cirrhose biliaire focale à 30% (entre 15 et 70 %) et celle de la cirrhose multilobulaire avec développement d'une hypertension portale entre 5 et 10 % des cas [12].

La stéatose hépatique ne présente pas de caractères particuliers, elle est surtout présente chez les très jeunes enfants, et régresse ensuite habituellement.

Une hépatite néonatale peut se rencontrer, en dehors des causes virales habituelles. La cholestase est rare et habituellement transitoire en période néonatale.

La cirrhose biliaire focale est pathognomonique de la mucoviscidose. Histologiquement, on retrouve une prolifération des canaux biliaires, des bouchons de mucus dans la lumière des canaux biliaires et une fibrose d'intensité variable, lésions qui sont souvent distribuées en foyers multiples [13]. La fibrose s'étend progressivement dans le lobule, avec coalescence des foyers de cirrhose focale, et évolue vers la cirrhose biliaire multilobaire. Ces lésions de cirrhose sont habituellement muettes cliniquement et l'atteinte hépatique peut n'être reconnue qu'au stade des complications : insuffisance hépato-cellulaire, hypertension portale avec varices œsophagiennes.

Le diagnostic d'atteinte hépatique de la mucoviscidose est cliniquement difficile au tout premier stade de la maladie. L'atteinte hépatique apparaît le plus souvent au cours de la première décennie et pratiquement jamais après l'âge de 18 ans. Elle est plus fréquente chez les garçons que chez les filles ainsi que chez les patients qui ont un antécédent d'iléus méconial. L'atteinte hépatique doit être recherchée précocement par l'examen clinique, la biologie, et l'échographie.

Les examens biologiques usuels sont souvent décevants et on a rapporté l'existence de lésions de cirrhose alors que les transaminases, les gamma-glutamyl transpeptidases et les phosphatases alcalines sériques étaient normales [13].

Seconde cause de décès, l'atteinte hépatique est la manifestation la plus grave de la mucoviscidose.

- **Atteinte de la vésicule biliaire et de l'arbre biliaire**

L'atteinte biliaire est souvent associée aux différents types d'atteintes hépatiques précédemment décrites.

La fréquence des anomalies de la vésicule biliaire augmente avec l'âge, pour atteindre au moins la moitié des malades de plus de 15 ans. Il s'agit en premier lieu d'une microvésicule, observée chez 30 % des malades à l'autopsie et chez 16 à 20 % des grands enfants et adolescents [14]. Des calculs vésiculaires sont trouvés chez 4 à 5 % des malades tous âges confondus. La cholangite, secondaire à une sténose de la partie distale de la voie biliaire, est bien connue au cours de la mucoviscidose. La survenue d'une cholangite sclérosante, mise en évidence par cholangiographie percutanée ou rétrograde, reste controversée.

2.2. Manifestations respiratoires

2.2.1. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire [15,16]

Si l'insuffisance pancréatique, liée à un processus de fibrose très particulier, et les troubles digestifs et nutritionnels qui lui sont rattachés constituent l'une des traductions physiopathologiques majeures du déficit génétique de la mucoviscidose, l'atteinte respiratoire, quant à elle, constitue la principale cause de morbidité et de mortalité au cours de la mucoviscidose.

Chez le sujet sain, la stérilité des poumons et des voies aériennes est assurée par l'action coordonnée des défenses antimicrobiennes non spécifiques et spécifiques, locales et générales. Chez les patients atteints de mucoviscidose, en dehors de tout déficit de l'immunité générale, cette stérilité ne peut être maintenue par les mécanismes locaux de défense.

Alors que des lésions peuvent être observées dans divers tissus extrapulmonaires chez le fœtus, le poumon ne présente pas d'anomalies particulières au moment de la naissance, tout au plus une hypertrophie des glandes sous-muqueuses et une hyperplasie des cellules à mucus de la trachée et des grosses bronches.

Rapidement après la naissance, une expression pulmonaire de la maladie va être déclenchée et amplifiée. L'atteinte pulmonaire débute par l'obstruction progressive des petites voies respiratoires objectivée par la précocité des anomalies radiologiques et des bouchons muqueux dans le lavage broncho-alvéolaire. Cette obstruction est la conséquence directe de

l'absence de protéine CFTR normale au niveau des cellules épithéliales conduisant à des perturbations des transports ioniques avec déshydratation du film séro-muqueux et défaillance du système d'épuration muco-ciliaire. Il se produit alors une accumulation de sécrétions visqueuses, et de bactéries capables de se fixer sur les mucines. Ainsi la stase favorise l'installation d'une surinfection pulmonaire devenant rapidement chronique, associée à un processus inflammatoire particulièrement marqué. En outre, il semblerait selon plusieurs études, que l'inflammation soit la conséquence directe des mutations de CFTR et que son apparition précède l'infection. Primitifs ou secondaires, les processus inflammatoires et infectieux vont alors s'autoentretenir et sont responsables de la dégradation du tractus respiratoire avec altération de la fonction d'échanges gazeux progressivement irréversible.

D'abord localisées aux voies aériennes périphériques, infection et inflammation gagnent secondairement les gros troncs bronchiques où elles majorent l'hypertrophie des glandes et la multiplication des cellules à mucus. Bronchiolite et bronchite, aiguës puis chroniques, se caractérisent par un infiltrat pariétal cellulaire mixte où prédominent les polynucléaires neutrophiles. L'épithélium est hyperplasique, avec parfois des formations papillaires et une métaplasie squameuse, ou bien détruit. Les ulcérations peuvent déboucher sur de véritables abcès endobronchiques débordant sur le parenchyme adjacent. Les lésions anatomiques évoluent alors vers l'obstruction inflammatoire puis fibreuse des bronchioles (bronchiolite oblitérante), un broncho-emphysème avec fibrose interstitielle et une dilatation des gros troncs bronchiques. A un stade évolué, le poumon se présente comme une véritable éponge où de rares zones ventilées souvent surdistendues, alternent avec les territoires rétractés ou condensés et les formations kystiques remplies de pus et de sécrétions muqueuses. La vascularisation bronchique, très riche dans les territoires bronchiectasiques peut donner lieu à des hémoptysies.

2.2.2. Présentation clinique : la bronchopathie chronique obstructive [17]

La bronchopathie chronique obstructive (*BPCO*) est pratiquement constante, et précoce. Elle se révèle dans 90% des cas avant l'âge d'un an. Son absence, possible dans certains cas à l'âge adulte, n'exclut pas une apparition ultérieure.

Les symptômes initiaux sont sans caractère spécifique : toux prolongée soit sèche et quinteuse simulant une coqueluche, soit plus souvent productive, isolée ou associée à d'autres signes respiratoires (polypnée, wheezing : bruit respiratoire audible sans stéthoscope) ;

rhinobronchites ou bronchites récidivantes ; encombrement bronchique et expectoration mucopurulente persistant entre deux épisodes aigus. L'expectoration n'est pas toujours facilement extériorisée, en particulier chez le nourrisson qui la déglutit.

L'évolution de l'atteinte broncho-pulmonaire est insidieuse, lentement progressive, émaillée de poussées au cours desquelles l'infection prédomine. Ces exacerbations peuvent se manifester par une aggravation de la toux et de l'encombrement bronchique, une purulence de l'expectoration, une asthénie, une anorexie, un amaigrissement et, parfois, une fièvre, mais rarement élevée. Chaque poussée aggrave l'état pulmonaire antérieur pour conduire à un tableau de dilatation diffuse des bronches et à l'insuffisance respiratoire chronique en quelques mois à plusieurs dizaines d'années. Le décès survient, en règle générale, au décours d'une aggravation des signes respiratoires d'allure infectieuse. Le tableau d'insuffisance respiratoire terminale s'accompagne d'une intoxication progressive par le gaz carbonique, accompagnée de signes d'insuffisance cardiaque droite ou globale dans environ 25 % des cas.

La dystrophie thoracique, l'hippocratisme digital, précèdent l'insuffisance respiratoire. La cyanose traduit une désaturation oxyhémoglobinique déjà significative. A un stade avancé, l'hypotrophie staturale et pondérale est davantage le reflet de l'atteinte respiratoire que de l'atteinte digestive.

L'auscultation thoracique est souvent très pauvre (râles crépitants ou sous crépitants...).

Les signes radiologiques, quant à eux, contrastent souvent avec la pauvreté des signes physiques et fonctionnels au début de l'évolution. Ces aspects radiologiques sont évocateurs par l'association, l'importance, la précocité d'apparition et la diffusion d'images bronchiques et alvéolaires pourtant non spécifiques : épaississement péribronchique avec images en rail, distension pulmonaire avec emphysème, atélectasies segmentaire ou sous segmentaire en bande, foyer alvéolaire mal systématisé, opacité aréolaire cernant des bronchectasies « en bouquet ». Sans explication évidente, les lésions prédominent dans les sommets et à droite.

Les épreuves fonctionnelles respiratoires sont perturbées précocement. Les résistances pulmonaires sont augmentées chez les nourrissons. Les tests les plus précocement perturbés sont ceux qui explorent les voies aériennes de petit calibre, l'obstruction débutant à ce niveau. Distension thoracique et obstruction bronchiolaire peuvent être en partie réversibles sous

broncho-dilatateurs (bêta-2-mimétiques et/ou atropiniques de synthèse). Cette réponse est inconstante et variable dans le temps. Secondairement, le syndrome obstructif devient global puis s'associe à un syndrome restrictif. L'étude des saturations en oxygène à l'effort et au cours du sommeil précise le retentissement de la maladie. L'atteinte évolue inéluctablement vers l'insuffisance respiratoire avec hypoxémie et hypercapnie.

2.2.3. Complications au cours de l'évolution [17]

Diverses complications pulmonaires peuvent intervenir dans l'évolution de la maladie. Une hyper réactivité bronchique non spécifique (consistant en une obstruction excessive des bronches en réponse à des stimuli variés n'entraînant peu ou pas de réponse chez l'individu normal) touche plus de 20 % des patients. Elle est la conséquence d'altérations épithéliales secondaires à la bronchopathie qui favorisent une sensibilisation progressive aux allergènes inhalés. Le diagnostic d'hyperréactivité, cliniquement manifeste en cas de syndrome asthmatique, repose sur l'exploration fonctionnelle respiratoire par recherche d'une bronchoconstriction anormale après stimulation ou au contraire une bronchodilatation significative après traitement.

Le pneumothorax et le pneumomédiastin touchent 1 % des patients avant l'âge de 10 ans et 15% des patients après quinze ans. Le pneumothorax est volontiers récidivant. S'il est mal supporté, il peut être drainé. Les douleurs de type pleural sont fréquentes même en l'absence de pneumothorax visible.

La staphylococcie pleuropulmonaire, pleuro pneumopathie grave provoquant une hyperthermie, une altération de l'état général, une polypnée, une toux sèche, une cyanose et un météorisme ne survient plus que de manière exceptionnelle de façon inaugurale ou en cours d'évolution de la maladie.

Les hémoptysies ne sont pas rares après 10 ans. Si elles sont peu abondantes, il faut traiter la surinfection qu'elles traduisent. Si elles sont abondantes (1 % des patients), elles peuvent nécessiter une embolisation artérielle bronchique, voire une résection pulmonaire lobaire ou segmentaire, après localisation du saignement par endoscopie. Un épisode isolé ne change pas obligatoirement le pronostic à long terme.

Le reflux gastro-oesophagien constitue une complication fréquente et est lié à la surdistension thoracique, à l'augmentation répétée de la pression abdominale lors de la toux voire au mauvais état nutritionnel.

D'autres complications peuvent intervenir : aspergillose broncho-pulmonaire allergique (0,5 à 10 % selon les séries), surinfection à mycobactéries, abcès fongiques ou bactériens, viroses respiratoires, hypertension artérielle pulmonaire et insuffisance cardiaque.

2.2.4. Aspects microbiologiques de l'atteinte pulmonaire

L'étude des bactéries isolées au cours de la mucoviscidose faisant l'objet d'un chapitre entier, l'aspect microbiologique de l'atteinte pulmonaire n'est traité ici que de façon succincte.

Pratiquement constantes, évoluant telles des exacerbations intercurrentes sur fond chronique, les poussées infectieuses sont dues à des micro-organismes très variés. Elles surviennent parfois très précocement dans l'histoire naturelle de la maladie et conditionnent son pronostic en favorisant la détérioration progressive et inéluctable des fonctions respiratoires. L'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose est colonisé d'une part par des bactéries commensales du nasopharynx dont certaines potentiellement pathogènes telles que *S. aureus*, *H. influenzae* et *S. pneumoniae* et d'autre part par des bactéries issues de l'environnement, pathogènes opportunistes, telles que *P. aeruginosa* dont la participation dans la dégradation de la fonction respiratoire n'est plus à démontrer, mais aussi d'autres bacilles à Gram négatif non fermentants comme *B. cepacia*, *S. maltophilia*, et *A. xylosoxidans* [18].

L'atteinte respiratoire par les mycobactéries, qu'il s'agisse de tuberculose ou d'infection par les mycobactéries atypiques, demeure rare. Toutefois, des cas de détérioration importante de l'appareil pulmonaire par des mycobactéries atypiques en particulier *M. abscessus* existent, en particulier dans les suites de transplantation. C'est la raison pour laquelle la recherche des mycobactéries ne doit pas être négligée [19].

Legionella pneumophila est probablement responsable d'exacerbations infectieuses au cours de la mucoviscidose, mais l'appréciation réelle de son risque infectieux bute sur la

fréquence de l'infection par *P. aeruginosa* ; en effet cette dernière rend difficile l'isolement en culture de *L. pneumophila* et perturbe, en raison de réactions croisées toujours possibles, le diagnostic sérologique [19].

Aspergillus fumigatus est fréquemment rencontré dans les expectorations. Il s'agit, généralement, d'un simple portage, souvent au décours d'une antibiothérapie à large spectre. La simple découverte d'*Aspergillus fumigatus* dans les sécrétions trachéo-bronchiques ne suffit pas pour porter le diagnostic d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique, extrêmement rare, car il repose à la fois sur des éléments cliniques, une augmentation des IgE sériques et la présence de précipitines spécifiques. Les cas d'aspergillose invasive et d'aspergillome demeurent exceptionnels [19].

L'isolement de levures, en particulier *Candida albicans*, est également fréquent au cours de la mucoviscidose en particulier chez les patients traités par antibiotiques.

Tous les virus à tropisme respiratoire peuvent jouer un rôle aggravant. Classiquement, l'infection virale prédispose les poumons des patients à l'infection bactérienne, en particulier en altérant la fonction ciliaire. Les infections virales par les virus *influenzae*, *parainfluenzae*, ainsi que le virus respiratoire syncytial sont fréquentes chez les patients et ce dernier a été mis particulièrement en cause dans l'altération des fonctions respiratoires. Ce fait est d'autant plus à prendre en considération que nous disposons, aujourd'hui, d'une part de méthodes rapides de diagnostic et d'autre part d'antiviraux spécifiques vis-à-vis de ce virus pneumotrope connu pour être à l'origine d'épisodes aigus de détresse respiratoire chez le jeune enfant.

2.3. Atteinte de l'appareil génital [20,21]

98 à 99% des hommes atteints de mucoviscidose sont stériles en raison d'une azoospermie obstructive par absence congénitale des canaux déférents (congenital bilateral absence of vas deferens CBAVD). Sur le plan anatomique, il ne s'agit pas d'une agénésie vraie mais d'une atrésie secondaire des voies déférentes survenant pendant la vie fœtale ou dans l'enfance. Sont également atteints à des degrés divers, les épидидymes, les vésicules séminales et la prostate.

En principe, la femme atteinte de mucoviscidose n'a pas d'anomalie morphologique qui l'empêche d'avoir des enfants. Sa fertilité est souvent diminuée, en raison d'un épaissement de la glaire cervicale qui gêne la pénétration du sperme, au niveau du col de l'utérus. Un retard pubertaire ou une aménorrhée dus à la malnutrition peuvent être observés.

Chez la femme atteinte, une grossesse est envisageable, l'élément fondamental limitant étant l'état respiratoire et nutritionnel de la femme avant sa grossesse.

2.4. Manifestations ORL [17]

L'atteinte ORL se traduit par une sinusite chronique et une polypose nasosinusienne (polypes récidivants au niveau du nez et des sinus). Cette dernière entraîne une obstruction nasale et parfois une anosmie. L'ethmoïdite chronique conduit parfois à un élargissement caractéristique de la racine du nez. L'atteinte de l'appareil auditif est rare, aussi bien en ce qui concerne les otites récidivantes que l'hypoacousie. Cette dernière peut être causée par l'utilisation de certains antibiotiques (aminosides) nécessaires en période de surinfection pulmonaire.

2.5. Autres manifestations

Le diagnostic de mucoviscidose doit être évoqué devant d'autres manifestations, qui peuvent apparaître avec une fréquence plus ou moins importante, et à des âges variés et qui peuvent être :

- une hypotrophie pondérale isolée, inexplicée par ailleurs, souvent précoce (difficulté à récupérer le poids de naissance),
- Une forme oedémateuse avec hypoprotidémie et anémie (nourrisson),
- Un diabète insulino-dépendant : il apparaît tardivement par destruction des îlots de Langerhans,
- Atteintes rhumatologiques : les manifestations articulaires regroupent les arthropathies de la mucoviscidose, dont la fréquence est estimée entre 2 et 8,5 %, et l'ostéo-arthropathie hypertrophiante pneumique rencontrée chez 2 à 7 % des patients, qui associe un hippocratisme digital, des douleurs osseuses et articulaires des os longs et une périostose radiologique [22]. En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, des complications jusqu'alors méconnues sont dorénavant retrouvées dans l'évolution de la maladie ; globalement, $\frac{3}{4}$ des patients atteints de mucoviscidose auraient une ostéoporose ou au minimum une ostéopénie,

- Atteinte cardiovasculaire : les manifestations cardiaques sont souvent secondaires à l'hypoxie avec un tableau d'insuffisance cardiaque aiguë ou de cœur pulmonaire chronique. Des cas de myocardopathies ont été décrits chez le nourrisson,
- Syndrome de perte en sel : c'est un syndrome de déshydratation avec hyponatrémie par dégradation massive de sel au niveau de la sueur intervenant au cours d'hyperthermie ou de coup de chaleur.

3- EPIDEMIOLOGIE

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies héréditaires à issue fatale dans la population caucasienne. La maladie est présente dans la plupart des pays et particulièrement en Europe, aux Etats-Unis et au Canada, ainsi qu'en Australie et en Nouvelle-Zélande. Elle touche approximativement 60 000 personnes dans le monde [23].

En France, son incidence est estimée à environ 1/4600 naissances (Sarles et *al.*, 1999, Grosskopf et *al.*, 2003, Munck et *al.*, 2005 [24]) et on considère qu'environ 6 000 à 7 000 personnes doivent être atteintes par cette maladie. La fréquence des hétérozygotes, porteurs sains de la maladie, est estimée entre 1/25 et 1/30.

La fréquence de la mucoviscidose est nettement moins élevée dans les populations non caucasiennes. Chez les Noirs américains, son incidence est d'environ 1/15 000 naissances, et elle a été aussi trouvée dans des populations africaines sans héritage caucasien [25]. Elle est beaucoup plus rare chez les Asiatiques (approximativement 1/90 000 naissances). Dans certains pays, elle est vraisemblablement masquée par d'autres problèmes de santé.

En France, à l'initiative de l'association de malades, baptisée "Vaincre la mucoviscidose"(VLM) (ex Association française de lutte contre la mucoviscidose AFLM), un Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM) a été créé en 1992, avec l'objectif de recenser les malades atteints de cette maladie en France, d'améliorer la connaissance de leurs caractéristiques médicales, génétiques, épidémiologiques et sociodémographiques et ainsi de faire progresser les connaissances. Cet observatoire procède à un recueil annuel des données.

Dans le cas de la mucoviscidose, la fréquence relativement élevée de la maladie et les contraintes liées au traitement ont favorisé, en France, la création de CRCM ou "Centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose" qui ont vu le jour en 2002.

D'après le rapport de L'ONM, en 2004 [26], 4533 patients ont été vus par les centres participant à l'ONM dont la quasi-totalité d'entre eux (95%) par les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM). Les adultes représentent 38,4% de l'effectif, chiffre orienté à la hausse par rapport à celui de 2003 (37,9%). L'âge moyen de la population est de 15,9 ans, l'âge médian (valeur qui partage la population étudiée en deux parties égales) est égal à 14 ans. Le nombre de patients âgés de moins de 18 ans s'élève à 2791, soit 62,6%

de l'ensemble. Le rapport de masculinité (nombre d'hommes pour 100 femmes) est égal à 109, cette donnée étant relativement stable au fil des années. La prévalence sur l'ensemble du territoire (métropole et île de la Réunion) est en moyenne de 7,2 malades pour 100000 habitants. Celle-ci atteint un chiffre de 16 pour 100 000 dès les premières années de vie pour croître jusqu'à 20 ans (18 pour 100 000), ce qui reflète les quelques formes plus modérées de la maladie révélées tardivement. La prévalence décroît après 20 ans en lien direct avec la mortalité prématurée pour passer sous le seuil des 5 pour 100 000 après 35 ans.

En ce qui concerne la répartition géographique des patients observés en 2004 (Figure 1), la disparité entre les départements métropolitains est forte, la majorité des patients (environ 75% des patients) étant concentrée, dans un premier lieu, selon un axe nord-ouest (régions Nord-Pas-de-Calais, Haute et Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire), en second lieu, sur un arc est (régions Lorraine, Alsace, Franche-Comté, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte d'Azur). La prévalence qui est en moyenne de 7,2 malades pour 100000 habitants sur l'ensemble du territoire (métropole et île de la Réunion), présente également de fortes variations selon les départements, les plus fortes densités étant notamment observées dans le Finistère, le Var, à la Réunion (plus de 13/100000) ainsi que dans les départements de la Loire-Atlantique, de la Côte d'Or, de l'Ille-et-Vilaine, du Jura et du Calvados (11/100000) (Figure 1).

Les raisons de la forte prévalence de cette pathologie en Bretagne sont liées au fait que les populations celtes qui peuplent cette région depuis environ 2000 ans ont été refoulées par les invasions et sont restées relativement stables ; à la fréquence des mariages consanguins dans cette région, et à l'avantage sélectif des hétérozygotes face à certaines épidémies telles que le choléra et la typhoïde.

Les disparités dans la prévalence peuvent être également dues à la variabilité de l'offre de soins en fonction des régions, les patients se concentrant dans des endroits proches des CRCM.

À l'opposé, les départements français d'Amérique : Guadeloupe, Martinique, ainsi que la Guyane ont une prévalence très faible en raison même de l'origine des populations [27].

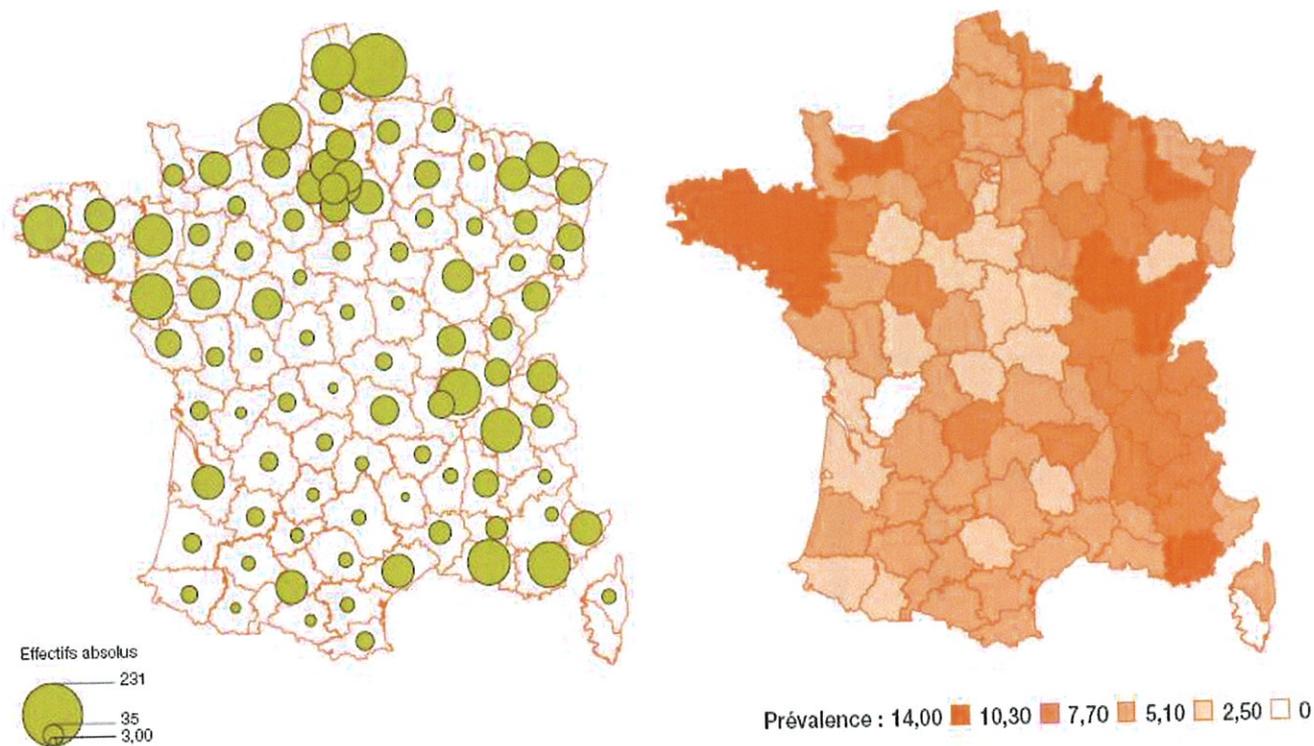


Figure 1 : Carte de gauche : Localisation des patients selon le département de résidence (effectifs absolus). Carte de droite : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100000 habitants). D'après le bilan des données 2004 de l'ONM [26].

Au cours de l'année 2004 [26], 52 décès ont été enregistrés. Sur la période 2002-2004, le taux brut de mortalité s'élève à 14,6 pour mille, l'âge moyen au moment du décès étant de 23,1 ans. Sur cette même période, l'espérance de vie à la naissance estimée à 42,4 ans et la vie médiane (durée de vie qu'un nouveau-né de 2002-2004 a une chance sur deux de dépasser si les conditions de mortalité demeurent inchangées) égale à 38 ans ont progressé par rapport à la période 2001-2003 (respectivement 39,1 et 36,4 ans) (figure 2).

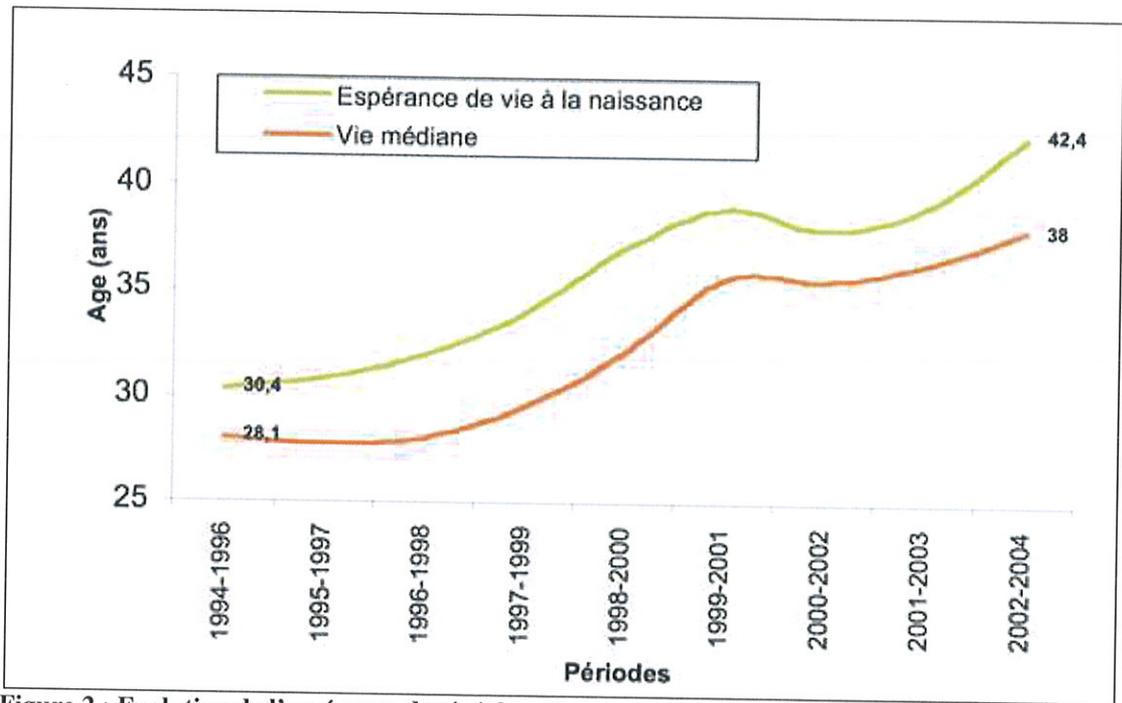


Figure 2 : Evolution de l'espérance de vie à la naissance et de la vie médiane entre 1994 et 2004. D'après Bellis G. 2007 [28].

D'après le rapport des données de l'année 2005 fourni par la Cystic Fibrosis Foundation [29], la prévalence de la mucoviscidose aux Etats-Unis est de 1/3500 naissances, environ 30000 personnes sont atteintes par la maladie et la durée de la vie médiane est de 36,5 ans.

4- GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive, monogénique, correspondant à l'altération d'un seul gène, le gène *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*).

4.1. Le gène CFTR

L'apparition du clonage positionnel (génétique inverse) a représenté une étape déterminante dans la découverte de l'anomalie génétique responsable de la mucoviscidose.

Après de nombreuses années de recherche alliant diverses méthodes de clonage par positionnement et de cartographie physique, la mise en évidence d'un site polymorphe exploré par une sonde anonyme a permis de localiser, en 1985, le locus CF sur le bras long du chromosome 7. Le gène impliqué, décrit en 1989 par les équipes de Lap-Chee Tsui (Canada), J. Riordan et F. Collins (USA) [3], s'étend sur près de 250 kilobases d'ADN et comprend 27 exons. Il est transcrit en un ARN messager de 6,5 kilobases et code une protéine de 1480 acides aminés : la protéine CFTR.

De nombreuses mutations ont été identifiées par la suite, dont la recherche sert désormais au diagnostic.

4.2. La protéine CFTR

4.2.1. Structure de la protéine CFTR [6]

L'analyse de la séquence primaire a permis de reconstituer la structure tertiaire probable de la protéine (Riordan 1989) (Figure 3). Cette protéine est formée de 5 domaines dont deux domaines hydrophobes transmembranaires (TMD 1 et 2) contenant six hélices α , deux domaines intracellulaires hydrophiles contenant des séquences susceptibles de lier l'ATP (NBF 1 et 2 ou *Nucleotide Binding Fold*) et un cinquième domaine cytoplasmique dit régulateur (domaine R) qui contient de multiples sites de phosphorylation par les protéines kinases A et C. Ces caractéristiques structurales ont permis de classer la protéine CFTR dans une famille de transporteurs membranaires, celle des protéines ATP-binding cassette (ABC)

qui transportent activement des substrats au travers des membranes cellulaires, l'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à ce transport. La protéine CFTR est un canal chlore de faible conductance dont la fonctionnalité est régulée par l'action concertée de l'ATP au niveau des régions NBF et par la phosphorylation/ déphosphorylation du domaine R. Cette protéine permet le transport des ions chlorures vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule et intervient dans la régulation d'autres canaux cellulaires tels que les canaux permettant le transport des ions sodium. L'absence ou l'anomalie de cette protéine chez les patients atteints de mucoviscidose est à l'origine de l'altération du transport des ions Cl^- , Na^+ et de l'eau entraînant la formation d'un mucus particulièrement visqueux au niveau du tractus respiratoire.

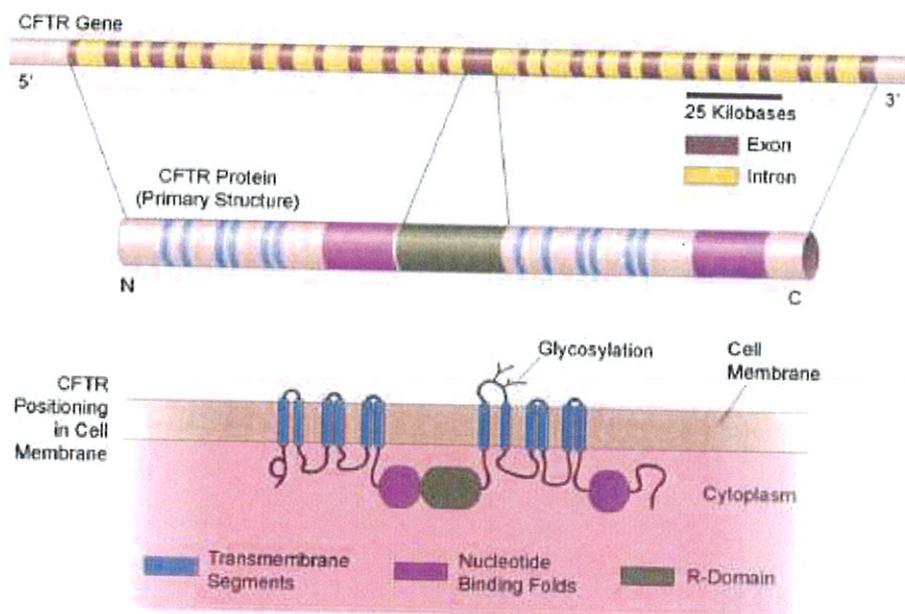


Figure 3 : Le gène *cftr* et la la protéine CFTR, d'après Gibson et col. [23]

4.2.2. Expression de la protéine CFTR

La protéine CFTR est exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des cryptes intestinales, des canaux pancréatiques et biliaires, de l'arbre trachéo-bronchique (en particulier au sein des cellules épithéliales des voies aériennes proximales et distales, bronchiolaires et alvéolaires), des tubules rénaux, de l'appareil génital et des glandes sudoripares.

4.2.3. Fonctions de la protéine CFTR [6,30]

La protéine CFTR présente de nombreuses fonctions au sein de l'organisme qui ne sont pas toutes totalement élucidées.

- Fonction canal chlore

Le tissu épithélial est composé d'une couche de cellules épithéliales polarisées avec un domaine apical en vis-à-vis du compartiment muqueux (lumière) et un domaine basolatéral reposant sur une lame basale. L'étanchéité des épithélia étant assurée par la présence d'abondantes jonctions serrées, les échanges trans-épithéliaux sont réalisés par les canaux ioniques, les transporteurs et les échangeurs.

Dans un épithélium sécréteur, le flux se fait du pôle basolatéral vers la lumière (figure 4). Les ions Cl^- entrent dans la cellule à travers la membrane basolatérale, par des co-transporteurs de type $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. la pompe Na^+/K^+ ATPase produisant la force motrice nécessaire à ce transport, et sortent du côté apical par diffusion passive à travers les canaux chlorures. Les ions Na^+ et K^+ absorbés en même temps que les ions Cl^- sont recyclés à la face basale par la pompe Na^+/K^+ ATPase pour les ions Na^+ et par des canaux potassiques pour les ions K^+ .

Flux hydro-électrolytiques transépithéiliaux

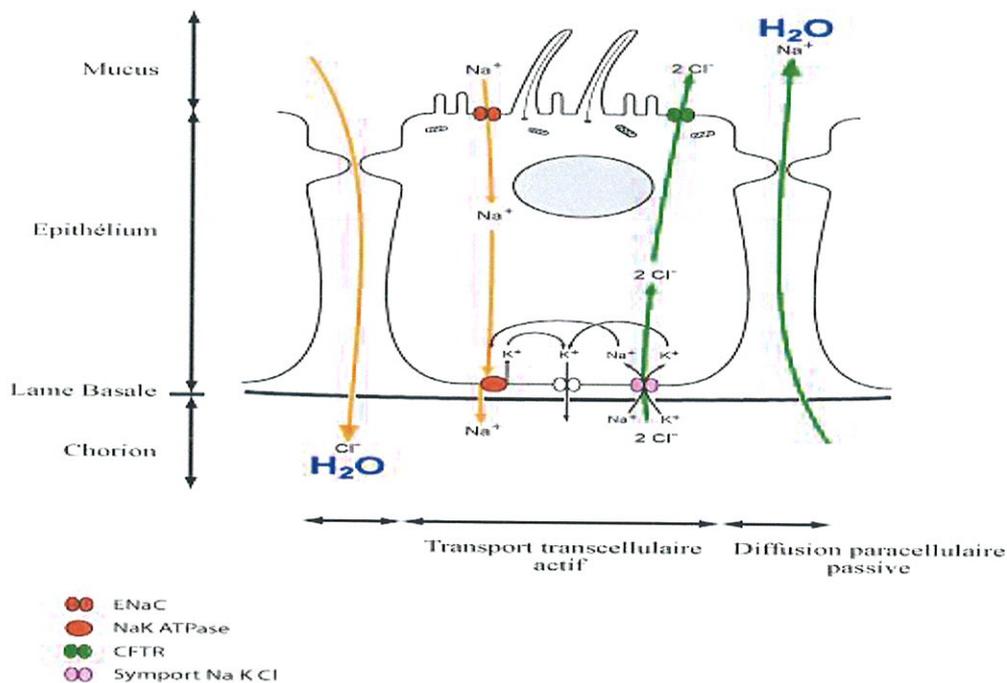


Figure 4 : Flux hydro-électrolytiques transépithéiliaux. D'après Carillo S. 2004 [31].

Les premières hypothèses émises sur la fonction de la protéine CFTR postulaient que la protéine était un canal chlore ou bien qu'elle agissait sur la régulation des canaux chlore. Des expériences de transfection du gène *cftr* normal dans des cellules de patients, pulmonaires (Rich 1990) et pancréatiques (Drumm 1990) ; de purification, de reconstitution dans des protéoliposomes et de fusion de CFTR dans une bicouche lipidique (Bear 1992), et enfin de mutagenèse dirigée dans des cellules qui n'expriment normalement pas CFTR ont permis de montrer que CFTR est un canal chlore de faible conductance régulé par la voie de l'AMP cyclique [6].

Le canal chlore fonctionne de la façon suivante : la phosphorylation d'une ou plusieurs des sérines régulatrices du domaine R par la phosphokinase A permet la fixation de l'ATP sur NBF1. Ceci induit une modification de conformation de la protéine et l'ouverture du pore. Si le domaine R n'est que partiellement phosphorylé, l'ATP est hydrolysé en ADP et le canal se referme, si toutes les sérines régulatrices du domaine R sont phosphorylées, une molécule d'ATP peut se fixer sur NFB2 et stabiliser le canal dans sa conformation ouverte.

Les ions chlorures passent à travers ce canal selon un gradient électro-chimique. Dans les cellules épithéiliales bronchiques, le gradient favorise le passage de l'intérieur vers la lumière.

Ainsi, les patients mucoviscidosiques présentent une rétention d'ions Cl⁻ dans les cellules épithéliales bronchiques s'accompagnant d'une rétention passive d'eau ce qui a pour conséquence une déshydratation du film hydrique de surface et une diminution de la clairance muco-ciliaire.

C'est l'inverse au niveau des glandes sudoripares : le canal chlore favorise la récupération des ions Cl⁻ contenus dans la sueur, et par conséquent, la sécrétion sudorale des patients est riche en chlorure de sodium.

- Régulation d'autres canaux ioniques [32]

Plus récemment, il a été montré que la protéine CFTR régule le fonctionnement d'autres canaux ioniques de la cellule épithéliale. En particulier, elle active un autre canal chlore, appelé ORCC pour canal chlorure rectifiant sortant (*outwardly rectifying chloride channel*) qui était supposé, avant le clonage du gène *cftr*, être le produit défectueux dans la mucoviscidose. La libération d'ATP intracellulaire au cours de l'activation de la protéine CFTR permettrait en effet l'activation des canaux ORCC par un mécanisme autocrine. L'ATP, une fois sorti de la cellule, se fixerait à un récepteur purinergique. Celui-ci va, à son tour, activer, par l'intermédiaire d'une protéine G, l'ouverture du canal ORCC et l'efflux d'ions Cl⁻.

La protéine CFTR activerait également les canaux chlore calcium dépendant par l'intermédiaire de l'ATP provoquant une sécrétion d'ions chlorures.

L'activité du canal sodique sensible à l'amiloride ENaC, responsable d'une absorption d'ions sodium au pôle apical de la cellule épithéliale, est également contrôlée par la protéine CFTR, mais de façon négative. Le défaut de CFTR se traduit par conséquent par une rétention intra-cellulaire de chlore associé à une hyperabsorption sodique via le canal ENaC.

- Autres fonctions

La protéine CFTR a de nombreux autres rôles dans la cellule.

Elle intervient également dans le recyclage des membranes en favorisant les phénomènes d'exocytose et en inhibant ceux d'endocytose. Elle régule le pH intracellulaire en acidifiant les compartiments intracellulaires.

La protéine CFTR joue un rôle dans la défense antibactérienne. Il a été en effet démontré que la concentration anormalement élevée en NaCl du liquide de surface bronchique des

patients inhibe l'activité bactéricide de petits peptides anti-bactériens (β -défensines) actifs sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

La protéine CFTR régule également la sécrétion des mucines. Chez le malade, il existe une hypersécrétion de mucines non contrôlable par les agonistes bêta-adrénergiques, à laquelle participe le bacille pyocyanique.

Enfin, la protéine CFTR semble jouer un rôle dans la réaction inflammatoire, dont les mécanismes restent encore inconnus. Celle-ci survient de façon très précoce, précédant l'infection. Des lavages broncho-alvéolaires réalisés chez des nourrissons, en dehors de toute infection, montrent un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à celui des témoins, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une nette diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles semblent être des partenaires clés des cellules épithéliales dans ces processus inflammatoires, dont les cytokines IL8 (interleukine) et TNF-alpha (tumor necrosis factor) semblent être des médiateurs prépondérants.

4.3. Les mutations du gène CFTR

Depuis la découverte du gène CF, une centaine de laboratoires tentent de caractériser les diverses mutations responsables de la mucoviscidose. Ils sont associés au sein d'un réseau d'échange d'information, le Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, CFGAC (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Ainsi plus de 1500 altérations du gène *cftr* ont pu être identifiées à ce jour. La mucoviscidose constitue ainsi un remarquable modèle d'hétérogénéité allélique. Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles, concernant le plus souvent une seule paire de bases. Tous les types de mutations ont été retrouvés : mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre), non-sens (transformation d'un codon d'acides aminés en signal de terminaison de traduction de la protéine, ou signal stop), insertions ou délétions conduisant à un déphasage du cadre de lecture de l'ARNm-CFTR, mutations altérant l'épissage.

En 1989, lors de la découverte du gène, le défaut moléculaire causal le plus fréquent a été identifié : la mutation delta F 508 (DF508) correspondant à la délétion de trois nucléotides aboutissant à l'élimination de la phénylalanine en position 508. Cette mutation est retrouvée, en moyenne, sur 70% des chromosomes mutés.

Au cours d'une étude réalisée en 1997 [33], l'analyse de 27177 chromosomes CF en provenance de 29 pays européens et de 3 pays d'Afrique du Nord a permis d'établir la distribution géographique de 272 mutations. Les 5 mutations les plus fréquentes sont deltaF508 (66.8%), G542X (2.6%), N1303K (1.6%), G551D (1.5%) et W1282X (1.0%). Ces fréquences globales présentent des disparités importantes de répartition. Ainsi, il existe un gradient décroissant nord-sud dans la fréquence de la mutation majoritaire deltaF508, cette mutation ayant une fréquence de 87.2% au Danemark et de 26.3% en Algérie. Ce gradient serait le reflet des vagues successives de migration ayant contribué à la constitution des différentes populations de l'Europe actuelle. La mutation G542X est commune dans les pays méditerranéens avec une fréquence moyenne de 6.1%. N1303K est particulièrement fréquente en Tunisie (17.2%). La mutation G551D est fréquente en Europe du nord-ouest et centrale. La plus forte fréquence de la mutation W1282X est retrouvée en Israël au sein de la population des juifs ashkénazes (36.2%), et est également fréquente dans les pays méditerranéens et en Afrique du nord. Au total 22 des 272 mutations étudiées sont relativement communes, avec des fréquences supérieures à 1% pour les cinq plus fréquentes et comprises entre 0,1 et 0,9% pour les 17 autres, 55 mutations ont des fréquences significatives dans certains pays seulement et 217 autres mutations semblent être des mutations privées.

L'analyse des marqueurs intra-géniques associés à la deltaF508 suggère qu'un seul événement mutationnel est intervenu dans le passé et s'est propagé en Europe à partir d'un ancêtre commun. Pour expliquer comment cette mutation a pu se répandre avec une telle fréquence dans la population, l'hypothèse d'un avantage sélectif a été avancée. Les hétérozygotes seraient protégés contre la déperdition hydrique et saline survenant au cours des diarrhées, dues par exemple à des entérotoxines d'*Escherichia coli* ou *Vibrio cholerae* et qui représentaient une cause principale de mortalité infantile dans les populations primitives.

- Classification des mutations [6]

Sur la base des données obtenues par l'étude de mutants CFTR construits par mutagénèse dirigée et exprimés dans des systèmes cellulaires hétérologues, Welsh et Smith ont proposé, en 1993, une classification des mutations selon le niveau d'altération de la protéine CFTR.

La **classe I** regroupe les mutations qui altèrent la **production de la protéine**. Il s'agit de mutations non-sens (G542X), de mutations d'épissage et de micro-insertions ou micro-

délétions qui entraînent un décalage du cadre de lecture et la synthèse d'un ARNm tronqué instable, qui de ce fait ne peut pas être traduit en protéine.

La **classe II** comprend des **mutations qui perturbent le processus de maturation cellulaire** de la protéine. La mutation DF508 appartient à cette classe : la perte d'une phénylalanine en position 508 modifie le repliement normal de la protéine, étant mal conformée, elle sera dégradée, peu après sa synthèse, dans le réticulum endoplasmique. La mutation N1303K fait partie de cette classe (mutation faux sens).

La **classe III** contient des **mutations qui altèrent la régulation du canal chlore CFTR**, le plus souvent faux-sens et qui concernent le plus souvent des régions codant pour les domaines de liaison à l'ATP. L'exemple type est la mutation G551D.

La **classe IV** regroupe les **mutations qui altèrent la conduction du canal chlore** conduisant à une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. L'exemple type est la mutation R117H (mutation faux sens).

Depuis la classification de Welsh et Smith, d'autres classes de mutations ont été proposées. La **classe V** comprenant des **mutations d'épissage, non-sens ou faux sens, altérant la stabilité de l'ARNm** : le canal présent à la membrane est fonctionnel mais en nombre restreint.

La **classe VI** comprenant des **mutations altérant la stabilité de la protéine mature**.

Les mutations de classe I et II sont toujours sévères : elles entraînent une forte expression de la maladie dans l'organisme. Ce sont les mutations le plus fréquemment retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose.

- Corrélation génotype / phénotype [6,30]

Il n'y a pas de relation simple entre le génotype et le phénotype pouvant rendre compte des variations cliniques entre patients non apparentés ou au sein d'une même fratrie. La plupart des mutations CF ne sont trouvées que sous la forme d'hétérozygotes composites, ce qui complique l'analyse des corrélations.

Cependant, on a pu observer qu'à l'état homozygote, DF508 est associée à la forme classique de la maladie avec une augmentation des électrolytes dans la sueur, une insuffisance pancréatique et une atteinte des poumons le plus souvent sévère.

D'une manière générale, la fonction pulmonaire, l'âge du début de la maladie et le taux de chlore sudoral sont difficilement corrélés à un génotype particulier.

D'autre part, la gravité et la variété des symptômes observés au sein d'une même fratrie laissent prévoir que le génotype seul ne peut expliquer le phénotype.

Seul le statut pancréatique paraît clairement déterminé par les mutations CFTR. Il y a une corrélation manifeste entre l'homozygotie deltaF508 et l'insuffisance pancréatique exocrine (PI, *pancreatic insufficiency*), alors que les patients hétérozygotes composites pour la deltaF508 et une autre mutation sont CF-PI lorsque la seconde mutation est « sévère » et sont CF-PS (*pancreatic sufficiency*) lorsque la seconde mutation est « modérée ». Les mutations PS, essentiellement des mutations faux-sens ou des altérations de l'ARNm compatibles avec une activité CFTR résiduelle dans le pancréas, sont ainsi dominantes sur les mutations PI (mutations d'épissage, non-sens ou décalant le cadre de lecture).

L'analyse des corrélations génotype-phénotype est encore compliquée par le fait que l'effet d'une mutation peut être modulé par une deuxième mutation héritée en cis sur le même allèle. En particulier, l'analyse fine du gène CFTR a montré l'importance d'une séquence nucléotidique polypyrimidique polymorphe (polyT) situé dans l'intron 8 constituée selon les cas de cinq, sept ou neuf thymidines. Le variant 5T altère l'épissage de l'exon 9 ce qui conduit à une diminution de la quantité de protéine CFTR produite à partir de cet allèle. Ceci indique que le polymorphisme nucléotidique se comporte comme une mutation à effet délétère très modéré, susceptible d'aggraver l'effet d'une autre anomalie. Ainsi, une même association de mutations (deltaF508/R117H) retrouvée chez des patients au phénotype différent, était responsable chez certains d'une mucoviscidose d'expression modérée et chez les autres d'une infertilité par absence bilatérale des canaux déférents. Cette différence phénotypique a été expliquée par le fait que la mutation R117H était associée en cis au variant 5T chez les patients atteints de mucoviscidose et au variant 7T chez les autres.

5- DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la mucoviscidose a longtemps été suspecté sur les seuls signes cliniques (pulmonaires, digestifs...). L'apparition du test de la sueur (Di Sant'Agnese 1953) [4] et sa standardisation (Gibson et Cooke 1959) [5], ont permis de disposer d'une confirmation biologique ; ce test reste aujourd'hui un argument diagnostique majeur.

Depuis la découverte du gène de la mucoviscidose en 1989, l'analyse génétique est systématiquement réalisée à la recherche des mutations. L'association d'une forme clinique typique à une mutation fréquente signe la maladie. En revanche, le polymorphisme du gène *cftr* est si important qu'il peut être difficile de relier une anomalie à une mucoviscidose maladie en particulier dans les formes cliniques incomplètes ou atypiques révélées tardivement. Le recours aux explorations spécifiques telles que l'étude de la fonction ventilatoire, la mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal devient alors nécessaire pour affirmer un diagnostic, suivre l'évolution de la pathologie ou évaluer le traitement.

Depuis 2002, un diagnostic néonatal reposant sur le dosage de la trypsine immunoréactive est disponible.

D'après les données de l'ONM [26], le nombre de patients diagnostiqués en 2004 est de 269 soit 5,9% de l'ensemble de la population suivie dans les centres participant à l'ONM (4533 patients) ; à titre de comparaison, les effectifs des nouveaux cas en 2002 et 2003 étaient respectivement de 215 (5,5%) et 231 (5,6%). Les signes d'appel du diagnostic les plus fréquents pour l'ensemble des patients vus dans les centres en 2004 étaient représentés par les problèmes respiratoires (41,7%), la diarrhée chronique/stéatorrhée/malabsorption (24%), le dépistage néonatal (20,1%) et le retard de croissance/malnutrition (19,4%). Le diagnostic de la mucoviscidose a été porté avant l'âge de 4 mois pour la moitié des 3827 patients de l'ONM dont on connaît l'âge du diagnostic.

5.1. Test à la sueur

La sueur contient une certaine concentration de NaCl qu'il est possible de mesurer par différentes techniques. Chez les malades atteints de mucoviscidose, cette teneur est supérieure à la normale. La glande sudoripare est composée de deux régions : la partie sécrétrice et le canal excréteur. La partie sécrétrice produit un liquide sudoripare quasiment isotonique. Dans le canal excréteur, imperméable à l'eau, le sodium est absorbé activement par les cellules épithéliales entraînant avec lui le chlore. La concentration de sel dans la sécrétion sudoripare recueillie sur la peau est donc relativement faible. Dans la mucoviscidose, les cellules épithéliales du canal excréteur sont imperméables au chlore qui n'est donc pas réabsorbé ; cette imperméabilité au chlore diminue l'absorption du sodium, et donc augmente la concentration de sel dans la sueur.

Le test à la sueur, non invasif, est interprétable après la sixième semaine de vie. Les anomalies de concentrations des électrolytes dans la sueur apparaissent dès la naissance et perdurent toute la vie. Cependant il n'existe pas de relation directe entre la sévérité des lésions pancréatiques et pulmonaires et le taux de chlorure sudoral. La technique décrite par Gibson et Cooke [5] reste, depuis plus de 40 ans, la méthode de référence dans le dosage du chlore sudoral.

La méthode comporte trois étapes [34]:

- stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine (molécule cationique douée de propriétés cholinergiques, qui, transportée au niveau des glandes sudoripares au moyen d'un gradient électrique, stimule leur sécrétion)
- recueil de la sueur, à l'aide d'un dispositif (disque de papier filtre (utilisé dans la technique de Gibson et Cooke), tubulure capillaire à paroi non mouillante : collecteur Macroduct*(Wescor) dans laquelle la sueur monte progressivement par capillarité),
- dosage du chlore et/ou du sodium dans la sueur :
 - o dosage de l'ion chlorure par la méthode de référence de Gibson Cooke : après extraction de la sueur à partir du papier filtre, le dosage du chlorure est réalisé par la méthode colorimétrique modifiée de Schales (résultats donnés en mmol de chlorures par litre de sueur),

- détermination de la conductivité électrique de la sueur (Sweat-Chek Model 3100 Wescor[®]) : le capillaire du collecteur Macroduct* rempli de sueur est connecté à la microcellule conductimétrique thermostatée de l'analyseur,
- électrode sélective à chlorures (Orion[®], Exsudose[®]).

Les valeurs seuils du test dépendent de la technique de dosage utilisée.

Interprétation du résultat

Le test à la sueur ne peut être réalisé chez le nouveau-né avant la cinquième semaine (augmentation transitoire du taux de chlorures). L'état clinique du patient doit être considéré pour l'interprétation (déshydratation, prise médicamenteuse...).

En cas de résultat douteux, le test doit être renouvelé. Deux tests positifs sont nécessaires pour affirmer le diagnostic.

Devant un tableau clinique évocateur et un test négatif, il ne faut pas oublier qu'il existe des faux-négatifs, et une recherche génétique peut s'avérer utile.

Age	Méthode	Normale	Incertitude	Mucoviscidose
1 mois à 18 ans	titrimétrie, coulométrie, électrode sélective	<45 mmol/l	45 à 60 mmol/l	>60 mmol/l
	conductivité	<55 mmol/l	55 à 75 mmol/l	>75 mmol/l
Adulte	titrimétrie, coulométrie, électrode sélective	<45 mmol/l	45 à 70 mmol/l	>70 mmol/l
	conductivité	<70 mmol/l	70 à 85 mmol/l	> 85 mmol/l

Tableau 1: Valeurs de référence de la concentration en chlorures dans la sueur. D'après Marchand et col. 1998 [34].

5.2. Mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal [35]

Cette technique a été mise au point par Knowles (Knowles 1981), puis modifiée et simplifiée par Alton (Alton 1987; Alton 1990). La valeur de la différence de potentiel transépithélial (DDPTE) qui existe entre la peau et la muqueuse nasale est significativement augmentée en cas de mucoviscidose. L'intérêt diagnostique de la mesure de la DDP nasale réside dans son absence de corrélation avec le test de la sueur : ainsi des DDP nasales anormales ont été rapportées pour des tests à la sueur normaux. La place de la mesure de la DDP nasale dans le bilan de la mucoviscidose reste très discutée. Il est clair que ce test n'a pas d'intérêt dans les formes typiques de la maladie. Par contre dans les formes cliniques atypiques associées à des tests de la sueur « limites », la DDP nasale avec stimulations pharmacologiques peut mettre en évidence une anomalie du transport ionique. Elle peut également être utilisée dans le suivi évolutif des patients puisqu'il existe une corrélation entre la gravité de l'atteinte respiratoire mesurée par l'étude du VEMS (volume expiré maximal par seconde) et les mesures de DDPTE.

Cet examen est bien toléré mais les résultats sont difficilement interprétables en cas d'inflammation de la muqueuse nasale ou en présence de polypes nasaux.

5.3. Dépistage néonatal [36,37]

C'est grâce à l'action depuis 1972, de l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE) que ce dépistage néonatal a pu être possible. Approuvé par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS), le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose s'est généralisé sur tout le territoire français depuis le début de l'année 2002. La mucoviscidose devient ainsi la cinquième maladie dépistée à la naissance, après la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie, l'hyperplasie congénitale, et la drépanocytose. Le but de ce dépistage systématique est que chaque enfant, pour lequel le diagnostic est confirmé, bénéficie d'une prise en charge immédiate selon un protocole de soins national.

Le test s'effectue en même temps que les autres dépistages néonataux, selon un protocole en plusieurs temps suivant l'organigramme présenté figure 5. Sur le prélèvement de sang séché réalisé au troisième jour de vie est réalisé un dosage de trypsine immuno-réactive (TIR)

par une méthode radioimmunologique ou immunofluorimétrique. Chaque valeur supérieure au seuil est contrôlée en doublet sur le même prélèvement et, si le résultat anormal est confirmé, une étude du génotype CFTR avec une trousse comprenant les mutations les plus fréquemment retrouvées dans la population française est mise en oeuvre.

Si deux mutations sont identifiées (homozygote), le diagnostic de mucoviscidose est posé et la prise en charge spécialisée immédiatement mise en route.

Si une seule mutation (hétérozygote composite avec une seconde mutation non identifiée ou hétérozygote vrai) est mise en évidence, le test de la sueur permettra de trancher entre les deux hypothèses ; un test de la sueur positif permet de confirmer le diagnostic ; un test normal est en faveur d'une hétérozygotie, situation qui sera expliquée au patient par un généticien.

Dans le cas où aucune mutation ne serait trouvée, un contrôle de la TIR sur un deuxième prélèvement sera réalisé à J21, et s'il reste élevé, le test de la sueur permettra de poser ou non le diagnostic. Dans la mesure où ce test peut conduire à une étude du génotype du nouveau-né en cas de résultat élevé de la TIR, il est obligatoire de recueillir le consentement signé des parents pour l'analyse de l'ADN de l'enfant.

Il est important de noter que l'hypertrypsiniémie n'est pas pathognomonique de la mucoviscidose ; il existe en effet des hypertrypsiniémies néonatales transitoires (associées à une hypoxie ou à une souffrance foetale) ou persistantes (associées aux trisomies 13, 18 ou 21, aux insuffisances rénales, aux pathologies pancréatiques, hépatiques ou intestinales).

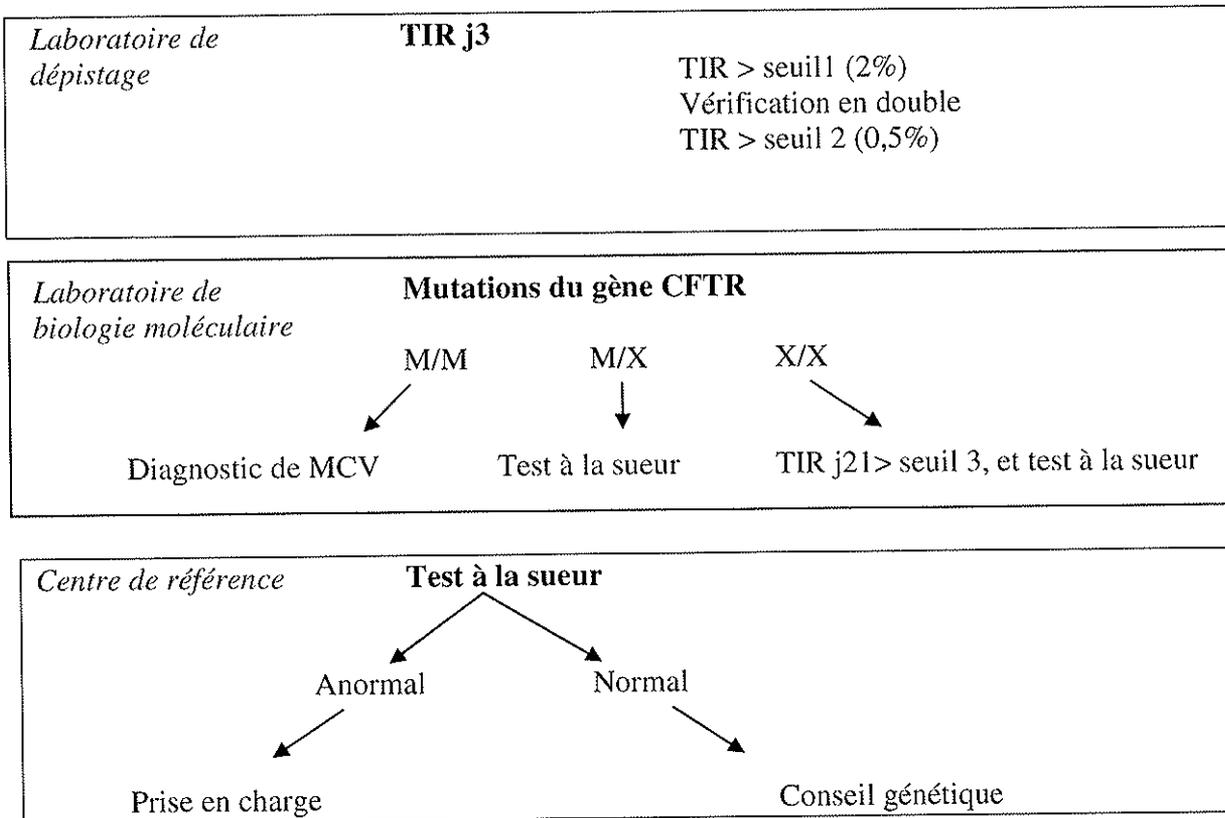


Figure 5 : Protocole du dépistage néonatal de la mucoviscidose.

M : allèle portant une mutation identifiée ; X : allèle sans mutation; CRCM : centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose ; TIR : trypsine immuno-réactive. Modifié d'après Feldmann. 2002. [36].

Selon les données de l'ONM [26], en 2002 (année de mise en place du diagnostic néonatal systématique) et en 2003, les effectifs des patients dépistés à la naissance par ce test étaient respectivement de 73 (34% des nouveaux cas) et 112 (48,5%). En 2004, le nombre des patients dépistés à la naissance était de 156 (58% des nouveaux cas). L'effectif de 156 pour l'année 2004 est à comparer avec l'effectif attendu pour cette même année qui, avec une incidence de 1/4600 et un nombre de naissances de 775000, serait de 168.

5.4. Dépistage moléculaire [30,38]

Les résultats des efforts importants déployés pour caractériser l'ensemble des très nombreuses mutations responsables de la mucoviscidose et pour connaître leur distribution géographique et ethnique ont permis de mettre en place des stratégies efficaces de diagnostic moléculaire. Par ailleurs, l'identification des mutations au sein des familles, permettant de connaître les conducteurs de la maladie est la base du conseil génétique.

Dans les formes atypiques de la maladie qui s'accompagnent d'un test de la sueur dans les limites de la normale, la mise en évidence d'allèles mutés est un élément de diagnostic.

Le grand nombre de mutations identifiées dans les chromosomes de patients oblige à mettre en place une stratégie par étapes. Dans un premier temps, les mutations les plus fréquentes sont recherchées à l'aide de kits commerciaux utilisant différentes techniques (reverse dot-blot, amplification allèle dépendante ARMS (*amplification refractory mutation system*) utilisant des amorces permettant l'amplification des allèles mutés les plus fréquents). 8 à 12 mutations fréquentes peuvent être testées simultanément avec ces kits permettant d'identifier 70 à 80 % des mutations CF dans de nombreuses populations.

Dans un deuxième temps, si les deux mutations n'ont pas été identifiées, ce qui se produit dans les populations caractérisées par une forte hétérogénéité allélique, une exploration systématique des exons CFTR est réalisée. Les séquences codantes et flanquantes du gène sont alors étudiées par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques permettant de détecter des modifications de séquence : DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), SSCA (*single strand conformation analysis*), HET (*heteroduplex analysis*), DHPLC (*denaturing high performance liquid phase chromatography*) [7]. Ces méthodes sont suivies d'un séquençage direct du produit PCR afin d'identifier les modifications de séquence.

Malgré l'exploration complète de la séquence codante, certains allèles CF restent non identifiés dans des mucoviscidoses confirmées cliniquement ou par un test de la sueur positif. Il est possible que des mutations CF encore inconnues siègent dans les introns (non explorés).

Conseil génétique

Les principales indications de l'étude du gène CFTR concernent les familles à risque (dans lesquelles il y a déjà eu un ou plusieurs sujets atteints de mucoviscidose).

- Pour les parents d'un enfant CF, le risque pour la descendance est de 25 % à chaque grossesse.
- La probabilité d'être hétérozygotes est de 2/3 pour les frères et sœurs d'un sujet atteint. La recherche de mutations pour préciser leur statut est facilitée par l'identification préalable des mutations en cause chez le malade et est importante dans le cadre d'un projet parental. Elle doit être complétée si l'individu est hétérozygote par la recherche chez son conjoint des principales mutations répertoriées dans la population d'origine de celui-ci. Dès lors

qu'une mutation délétère est identifiée chez le conjoint, le risque est de 1/4 et un diagnostic prénatal peut être proposé.

- Le risque pour la descendance d'un patient atteint de mucoviscidose dépend du statut du conjoint : s'il n'est porteur d'aucune mutation, le risque d'avoir un enfant atteint est très faible (mutation rare non détectée chez celui-ci), s'il est hétérozygote le risque est de 50%. Ce cas de figure concerne de plus en plus de femmes atteintes de mucoviscidose qui, pour un certain nombre procréent naturellement. Chez l'homme atteint de mucoviscidose, le recueil chirurgical des spermatozoïdes permet de proposer une fécondation *in vitro* par ICSI (*intra-cytoplasmic sperm injection*). Si la conjointe est identifiée comme hétérozygote, un diagnostic pré-implantatoire est possible depuis 1999.

Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal est proposé dans le cadre du conseil génétique aux couples ayant un risque de 25 ou 50%. Il consiste en une recherche de mutations sur l'ADN fœtal des villosités choriales après biopsie de trophoblaste à 12 semaines d'aménorrhée. Si le diagnostic prénatal par biologie moléculaire est impossible (mutations non connues...), une amniocentèse peut être réalisée à 18 semaines pour le dosage des isoenzymes de la phosphatase alcaline dans le liquide amniotique. Un taux normal peut éliminer une mucoviscidose. Un taux effondré peut correspondre à une mucoviscidose, mais aussi à une autre pathologie telle que la trisomie 21, une affection virale... ; un caryotype et une détermination de sérologies virales et parasitaires ciblées doivent alors être réalisés.

Dans le cadre du suivi de la grossesse, la découverte d'une masse hyperéchogène abdominale évoquant une obstruction digestive alors que le couple n'a pas d'antécédents familiaux peut faire suspecter une mucoviscidose chez l'enfant, ce qui représente environ 3% des cas. Dans ce cas, le diagnostic prénatal peut être proposé.

D'après les données de l'ONM [26], en 2004, les génotypes de 3880 patients ont été identifiés en 2004 ce qui représente 85,6% de la population. Les autres patients (14,4%) n'ont pas eu d'analyse génotypique ou ont un génotype constitué d'une ou deux mutations non recherchées ou non identifiées. Le génotype le plus fréquent est deltaF508/ deltaF508 (51,6% des génotypes identifiés), la proportion des génotypes deltaF508/autre étant de 37,3%.

II. ASPECTS BACTERIOLOGIQUES DE L'ATTEINTE PULMONAIRE DANS LA MUCOVISCIDOSE

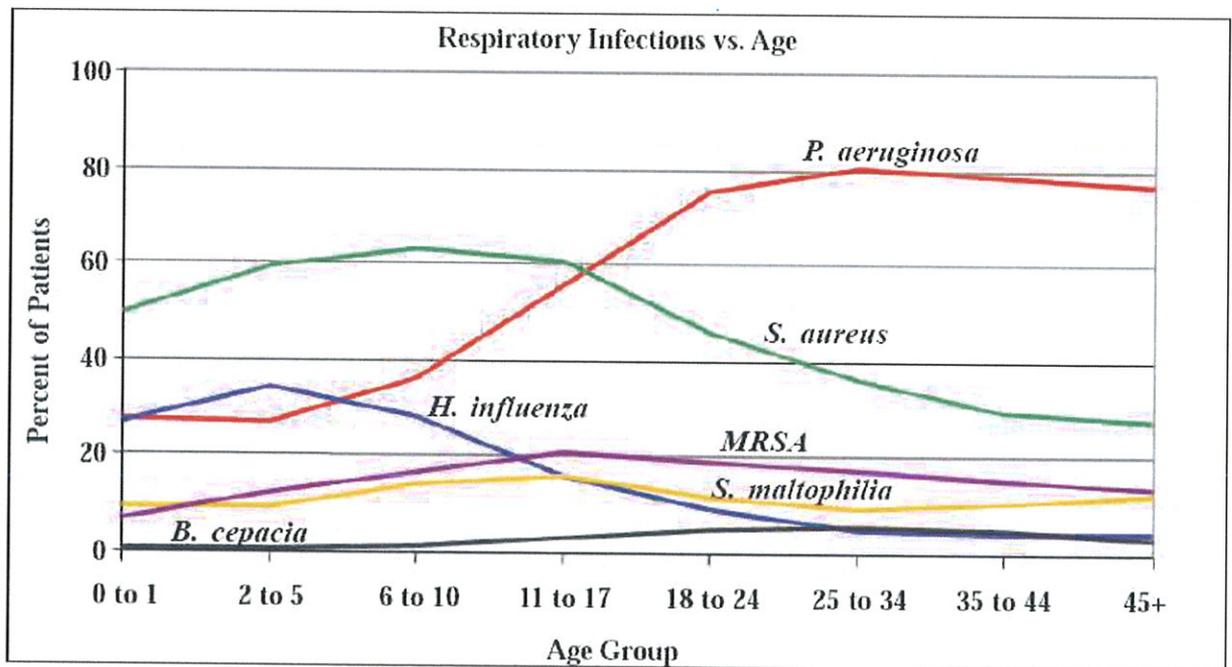
La prédisposition des patients mucoviscidosiques à l'infection pulmonaire était déjà mentionnée au cours des premières descriptions de la maladie à la fin des années 1930. L'atteinte infectieuse respiratoire constitue la manifestation physiopathologique majeure au cours de la mucoviscidose. Elle est favorisée par d'abondantes sécrétions visqueuses et par la défaillance du système muco-ciliaire qui conduisent peu à peu à l'obstruction des voies respiratoires, et par une réponse inflammatoire importante favorisant les surinfections. Les poussées infectieuses atteignant l'appareil respiratoire sont quasiment constantes au cours de la maladie et sont dues à de nombreux micro-organismes (bactéries, mycobactéries, levures, champignons et virus). D'apparition parfois très précoce dans l'histoire naturelle de la maladie (dès les premières semaines de vie), ces poussées sont à l'origine de la détérioration progressive et inéluctable de la fonction respiratoire.

Comme nous l'avons vu précédemment, la mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive liée à l'altération du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Cette protéine est un canal échangeur de chlore impliqué dans la régulation des échanges ioniques épithéliaux de chlore et de sodium. Au niveau de l'épithélium respiratoire, les mutations de cette protéine entraînent des perturbations des échanges ioniques conduisant à une déshydratation du film séro-muqueux. Or, la modification des propriétés rhéologiques du mucus, et notamment l'augmentation de sa viscosité, favorise l'accumulation et la fixation des bactéries aux mucines. De plus, la déficience des défenses locales, liée à la diminution des propriétés antibactériennes du mucus dans la mucoviscidose, ne permet pas de maintenir la stérilité du poumon et des voies aériennes inférieures. Tous ces éléments concourent à l'installation précoce d'une infection qui devient rapidement chronique, associée à une intense réaction inflammatoire.

L'insuffisance pulmonaire qui en résulte, est à l'origine de 95% des décès dans la mucoviscidose.

La colonisation et l'infection du poumon mucoviscidosique sont associées à un spectre relativement étroit de pathogènes opportunistes susceptibles de déjouer la réponse immunitaire de l'hôte. La séquence classique d'apparition des germes est la suivante : *Staphylococcus aureus* puis *Haemophilus influenzae* pendant l'enfance ; *Pseudomonas aeruginosa* à l'adolescence (figure 6). La colonisation chronique par *P. aeruginosa* joue un rôle majeur dans la détérioration respiratoire.

Cependant parallèlement à l'amélioration des traitements et à l'augmentation de l'espérance de vie, l'épidémiologie des bactéries rencontrées dans la mucoviscidose devient plus complexe avec l'émergence de nouveaux phénotypes (variants à petites colonies de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*, souches mucoïdes de *P. aeruginosa*) et de nouvelles espèces bactériennes, telles *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sp.*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.*... La fréquence de ces nouvelles espèces reste relativement faible bien que leur incidence augmente d'années en années ; le rôle pathogène de certaines d'entre elles n'est pas clairement déterminé. L'identification de ces nouvelles espèces qui sont parfois proches sur le plan phénotypique et ne sont pas toujours incluses dans les bases de données des galeries biochimiques constitue un défi pour le laboratoire de Bactériologie médicale.



Overall Percentage in 2005:

— <i>P. aeruginosa</i> 56.4%	— <i>H. influenza</i> 17.0%	— <i>B. cepacia</i> complex 3.1%
— <i>S. aureus</i> 51.8%	— <i>S. maltophilia</i> 12.3%	— <i>MRSA</i> 17.2%

Figure 6 : Prévalence de différents pathogènes lors d'infections pulmonaires chez des patients de différents âges atteints de mucoviscidose, en 2005. D'après Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2006 [29].

Remarque : L'Observatoire National de la Mucoviscidose a publié un graphique similaire pour l'année 2004.

1- COLONISATION/INFECTION A STAPHYLOCOCCUS AUREUS ET HAEMOPHILUS INFLUENZAE AU COURS DE LA MUCOVISCIDOSE

1.1. *Staphylococcus aureus* (SA)

Commensal du nasopharynx, *Staphylococcus aureus* a été le premier germe reconnu comme responsable d'infection broncho-pulmonaire et représentait la première cause de mortalité chez les enfants mucoviscidosiques avant l'ère des antibiotiques. Aujourd'hui, cette bactérie demeure très présente dans les sécrétions trachéo-bronchiques des jeunes enfants, voire des nourrissons. Les données françaises recueillies par l'Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM) en 1999 montraient pour 2 527 patients, une prévalence de SA dans l'ECBC de 53 % tous âges confondus, de 50 % avant l'âge de 1 an, 54 % entre 1 et 6 ans et 62 % entre 7 et 10 ans [39].

L'implantation de SA dans le tractus bronchique à partir d'un portage nasal est favorisée par la diminution de la clairance muco-ciliaire qui favorise sa stagnation. L'adhésion aux mucines bronchiques et/ou à la fibronectine des cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire est alors possible via certains constituants de sa paroi : les acides teichoïques et un complexe polysaccharidique de surface, le slime. L'adhésion est également facilitée par la présence de récepteurs bactériens tels que l'asialoganglioside-1 (aGM1) présent sur les cellules épithéliales bronchiques, et dont la densité est augmentée au cours de la mucoviscidose. Les infections notamment virales favorisent la colonisation à SA en dénudant les membranes basales [19,40].

Différents exoproduits sécrétés par SA (hémolysine, hyaluronidase, leucocidine, catalase, coagulase et exotoxines) participent à la dégradation tissulaire, constituant ainsi des facteurs de virulence et de colonisation. Par ailleurs, en détruisant la fibronectine présente à la surface des cellules épithéliales, ils permettraient de démasquer les récepteurs spécifiques des adhésines de *P. aeruginosa* et faciliteraient ainsi la colonisation par cette bactérie [19].

SA se multiplie et persiste pendant des mois voire des années au sein des voies respiratoires en dépit d'une antibiothérapie antistaphylococcique. La persistance de ce germe dans les voies respiratoires semble être le résultat d'un mécanisme de protection contre

l'élimination de cette bactérie par phagocytose ou par la réponse immunitaire locale. De plus, une importante hétérogénéité de la population de SA a été mise en évidence dans les expectorations des patients mucoviscidosiques, due à des : réarrangements génomiques (délétions, duplications, mutations ponctuelles dans la région variable du gène codant la protéine A, facteur de virulence important dans les infections respiratoires) [43]; réarrangements liés à la mobilisation de phages [41] -en particulier l'insertion ou la délétion de phages dans le gène de la bêta-hémolysine- ; transferts d'éléments mobiles [42]. Cette hétérogénéité, qui contraste avec la plus grande homogénéité des populations colonisant l'oropharynx et le nez, confère une capacité d'adaptation qui joue probablement un rôle dans la persistance de SA au sein des voies respiratoires [44].

Les souches de SA isolées lors de la mucoviscidose peuvent présenter un morphotype classique, mais aussi un morphotype nain (« variants à petites colonies » ou SCV : small colony variant). L'existence de « variants à petites colonies » à localisation intracellulaire, à l'abri des défenses de l'hôte et des antibiotiques, est probablement un des facteurs expliquant le caractère pérenne de SA au sein des voies aériennes bronchiques. Contrastant avec le phénotype normal de SA, ces variants poussent sous forme de colonies minuscules ou en forme d'œuf sur le plat, non pigmentées et non hémolytiques. Ils présentent des altérations dans l'expression des gènes de régulation et de virulence notamment une diminution de l'expression de l' α -hémolysine permettant leur localisation intra-cellulaire [45], un auxotrophisme pour différents facteurs de croissance en particulier la thymidine, la capacité à retourner au phénotype normal et une plus grande résistance aux antibiotiques que le morphotype classique [46]. Ils sont sélectionnés par le cotrimoxazole, ce qui est un argument pour déconseiller cet antibiotique dans le traitement de SA et apparaissent le plus souvent à un âge relativement avancé (âge médian 31,5 ans [46]).

Une étude allemande publiée en 2006 portant sur 252 patients a montré une prévalence de 17% de ce variant parmi les porteurs de SA qui représentaient eux-mêmes 48% de la population étudiée [46]. Une autre étude menée par Kalh et col. sur 6 ans de 1994 à 2000 a trouvé une prévalence plus importante de ce variant (46,1%), qui pourrait être la conséquence d'une utilisation plus large de cotrimoxazole dans la population étudiée [47].

Hormis les différents types morphologiques de *S. aureus*, on peut également distinguer différents types de SA selon leur sensibilité à la méticilline : les SA sensibles à la méticilline (SASM) et les SA résistants à la méticilline (SARM), résistants à l'ensemble des bêta-

lactamines. Les souches de SARM sont apparues dans les années 1960 aux Etats-Unis. La résistance à la méticilline, liée à une modification de la cible, est conférée par le gène *mecA* qui code une protéine de liaison aux pénicillines ayant une faible affinité pour les bêta-lactamines, la PLP2a. Une acquisition des SARM en milieu hospitalier est souvent invoquée, d'où la mise en place de mesures d'hygiène strictes pour prévenir des infections croisées. Cependant, l'augmentation bien connue des SARM communautaires joue certainement un rôle important dans l'augmentation de la prévalence des SARM chez les patients mucoviscidosiques. D'après l'ONM, en 2002, la prévalence était estimée à 10,9 % des ECBC cumulés des patients de moins de 18 ans et à 13 % des ECBC cumulés des patients de plus de 18 ans en France [48].

Des recommandations pour l'isolement de SA dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose ont été élaborées lors de la conférence de consensus sur la prise en charge du patient atteint de mucoviscidose de 2002 [49] : utilisation de milieux sélectifs (Chapman, ou milieux chromogènes), seuil inférieur de dénombrement de 10^2 UFC/ml, signalement des phénotypes SCV sur le compte rendu d'analyse.

1.2. *Haemophilus influenzae*

Commensal du tractus respiratoire supérieur, *Haemophilus influenzae* est l'un des agents pathogènes les plus fréquents chez les patients mucoviscidosiques les plus jeunes. D'après le bilan des données de 2004 de l'ONM, *H. influenzae* est retrouvé chez plus de 50% des patients âgés de 0 à 4 ans [26].

L'adhérence de cette bactérie est en partie due à la liaison spécifique de ses pili aux mucines humaines. La majorité des isolats issus de patients CF sont non capsulés et non-typables [50].

Une étude espagnole sur la dynamique de l'infection respiratoire par *H. influenzae* chez les patients CF, réalisée sur 7 ans et sur 30 patients a montré qu'une colonisation chronique par de multiples clones est retrouvée chez la plupart des patients [51]. La résistance aux antibiotiques est liée à la persistance des souches. Dans cette étude, environ 20% des souches sont productrices de bêtalactamases et 21% des souches présentent une sensibilité diminuée à

la ciprofloxacine. Une hyper mutabilité est plus fréquemment rencontrée parmi les souches de *H. influenzae* isolées de patients CF que dans la population générale. L'analyse de souches de *H. influenzae* par analyse de la protéine de membrane externe et par étude du génome par RAPD (Random Amplification of polymorphic DNA), effectuée au cours d'une étude réalisée sur 40 patients pendant 2 ans, a montré que les souches différaient d'un patient à l'autre et que les patients étaient le plus souvent colonisés par différentes souches dont certaines ont persisté pendant toute la durée de l'étude [52].

Le rôle de *H. influenzae* dans la progression de l'infection de l'appareil respiratoire et le processus inflammatoire n'a pas été clairement défini.

2- IMPORTANCE DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS DANS LA MUCOVISCIDOSE

2.1. *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

Bacille à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature monotriche, produisant le plus souvent de la pyoverdine et de la pyocyanine, catalase et oxydase positif, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. PA est une bactérie ubiquitaire, retrouvée principalement dans le sol ainsi que dans l'eau douce et salée.

La colonisation de l'arbre trachéobronchique par cette bactérie a une signification toute particulière dans la mucoviscidose, en raison de sa fréquence et du passage rapide et inéluctable à la chronicité. Cette colonisation s'accompagne, chez la plupart des patients atteints de mucoviscidose et à plus ou moins brève échéance, d'une exacerbation de la réaction inflammatoire locale et d'une dégradation progressive de la fonction respiratoire qui précipite l'évolution de la maladie [53-56]. Ainsi, la colonisation chronique à PA et les conséquences immunopathologiques des épisodes intermittents d'exacerbation pulmonaire sont les principaux facteurs de morbidité et de mortalité et constituent des éléments pronostiques majeurs. Le risque de mortalité est multiplié par 2,6 chez les patients qui acquièrent PA [56].

Après une période de colonisations intermittentes, PA s'établit dans le poumon mucoviscidosique de façon permanente et son éradication devient difficile voire impossible. Au cours de la colonisation, l'interaction hôte-pathogène conduit à la transformation des souches de PA, qui se présentent, dans un premier temps, sous forme de souches mobiles, non mucoïdes, et dans un deuxième temps sous forme de souches immobiles, mucoïdes, contenues dans un biofilm complexe. La virulence de PA chez les patients atteints de mucoviscidose s'explique en partie par l'apparition de ces souches mucoïdes productrices de quantités importantes d'alginate, exopolysaccharide qui entoure des microcolonies de PA et favorise la persistance de ce germe dans les voies respiratoires.

Cette colonisation induit la mise en place de traitements antibiotiques contraignants aux effets plus souvent palliatifs que curatifs.

2.1.1. Epidémiologie

Pseudomonas aeruginosa n'est pas un commensal habituel des voies aériennes de l'homme. En effet le taux de portage dans la gorge est généralement inférieur à 5% [57]. La prévalence de ce germe dans la mucoviscidose, est, en revanche, considérablement plus élevée et excède celle de tous les autres germes rencontrés au cours de cette maladie, progressant inexorablement au cours de l'enfance pour atteindre des taux proches de 80% chez les adultes.

D'après les données de L'ONM de 2004 [26], PA est présent chez 25% environ des patients âgés de 0 à 9 ans et atteint sa fréquence la plus élevée (73%) chez les malades de 30-34 ans.

L'infection à PA semble survenir plus tôt que ce que l'on pensait précédemment si l'on se base sur l'apparition d'une réponse immune : plusieurs études ont montré que la détection d'une réponse immune dirigée contre PA précédait de plusieurs mois la première culture positive au niveau de l'arbre bronchique [58,59]. Enfin, une étude réalisée au cours des trois premières années de vie de 40 patients a montré que 97,5 % des enfants présentaient à l'âge de 3 ans les signes bactériologiques et/ou sérologiques d'une colonisation par PA [58].

2.1.2. Facteurs de risques pour l'acquisition de PA

D'après une étude prospective portant sur 180 patients, le sexe féminin, le génotype homozygote deltaF508 et l'isolement de *S. aureus* constituent des facteurs de risque pour l'acquisition de PA au niveau de l'arbre bronchique [60].

2.1.3. Origine de la contamination

Les modalités de la contamination par PA des patients atteints de mucoviscidose ne sont toujours pas clarifiées. La colonisation initiale implique la plupart du temps une souche unique sans caractéristiques particulières et il existe une vaste distribution de génotypes de PA chez les jeunes enfants suggérant l'origine environnementale de la colonisation. L'analyse génomique par PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) d'isolats issus de patients et de l'environnement a montré que les souches de PA potentiellement pathogènes pour les individus CF peuvent être retrouvées presque partout [61]. Cependant, l'hypothèse émise dans un premier temps selon laquelle n'importe quelle souche de PA peut coloniser le poumon CF

pourrait ne pas être exacte, en effet les isolats de PA issus d'expectorations CF appartiennent à des pyocinotypes inhabituels suggérant que certaines sous-populations correspondant à des « souches élues » semblent avoir des prédispositions pour la colonisation du tractus respiratoire [62].

D'autre part, l'hypothèse selon laquelle une transmission interhumaine surviendrait essentiellement dans des circonstances de promiscuité particulière : fratries, camps de vacances, densité de patients importante dans un même service [63] a été ébranlée par la mise en évidence de souches agressives et transmissibles chez des patients pris en charge dans des centres spécialisés, certains de ces clones étant plus virulents que les souches habituelles issues de l'environnement. Une première souche hautement transmissible et virulente, LES (*Liverpool Epidemic Strain*), de sérotype O6, caractérisée par la présence d'une séquence spécifique PS21 utilisable pour la détection par PCR, a été individualisée à Liverpool en 1996 [64]. Le fait que cette souche, isolée chez 55 des 65 patients colonisés par *P. aeruginosa* dans ce Centre, n'ait pas été isolée dans l'environnement, ait été impliquée dans des surinfections chez des patients déjà colonisés, et même chez les parents sains d'une patiente atteinte de mucoviscidose plaide pour sa réelle transmissibilité. Par la suite, il a été montré au cours d'une étude incluant 31 centres en Angleterre et au Pays de Galles, que les isolats appartenant à ce clone représentaient 11% des isolats de PA [65], et que cette souche pouvait être retrouvée dans l'environnement des sujets colonisés (air de la chambre, mains, équipement respiratoire), l'air jouant certainement un rôle dans la transmission [66]. De même, un clone épidémique particulièrement virulent a été mis en évidence dans plusieurs villes d'Australie (Melbourne, Sydney, Brisbane) [67,68]. Enfin, une étude épidémiologique danoise [69] a montré la prédominance de deux génotypes distincts de PA chez des patients CF pris en charge dans un centre de soins.

Le clone C, qui constitue un clone prédominant, a été retrouvé dans le monde entier, notamment au Canada, en France, en Allemagne, et en Angleterre, dans l'environnement aquatique et chez les patients mucoviscidosiques [70]. Ainsi, l'existence de clones dominants et probablement transmissibles de *P. aeruginosa* plaide en faveur d'une surveillance épidémiologique accrue et d'une politique de ségrégation des patients.

Enfin, les génotypes des souches de PA issues des voies aériennes supérieures et inférieures et collectées simultanément diffèrent : des souches génétiquement distinctes peuvent coloniser des sites anatomiques différents chez les patients atteints de mucoviscidose [71].

2.1.4. Etapes de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* : primocolonisation, colonisation chronique, infection

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de l'arbre bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose suit plusieurs étapes importantes : la première étape consiste en une phase de contamination et de primo-colonisation, au cours de laquelle l'éradication de la bactérie est possible, suivie d'une étape de colonisation chronique marquée par l'apparition de souches mucoïdes et de manifestations pulmonaires aiguës (figure 7). Les définitions de la primocolonisation, de la colonisation chronique et de l'infection ont été établies par le consensus européen en 1999 [74] ; elles reposent sur les résultats des cultures successives et des techniques sérologiques, ainsi que sur la présence ou l'absence de signes directs (inflammation, fièvre...) d'infection.

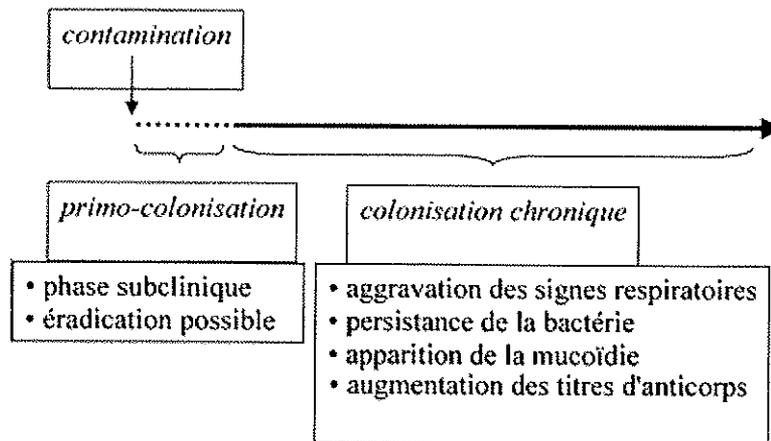


Figure 7 : Infection pulmonaire à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose. D'après Plésiat P. 2002 [72].

La présence de PA peut être détectée par la réalisation régulière, tous les 2 à 3 mois, d'examens cyto bactériologiques des expectorations qui constituent la méthode de base pour l'analyse de la flore bronchique des patients en utilisant des milieux sélectifs pour PA tel que le milieu au cétrimide.

Pour pallier le manque de sensibilité de la culture dans la détection de faibles inoculums pulmonaires, il apparaît intéressant de la compléter par des approches sérologiques incluant la recherche d'anticorps anti-pyocyanique spécifiques, qui peuvent révéler une production précoce d'anticorps anti-pyocyanique chez les malades. De plus, la sérologie antipyocyanique peut être utile pour prédire l'évolution plus ou moins rapide de la dégradation pulmonaire étant donné qu'une augmentation quantitative et qualitative importante des anticorps au cours de la phase chronique de l'infection est observée, lorsque la réaction inflammatoire

s'intensifie. Cependant, les méthodes utilisées (immuno-électrophorèse, ELISA, western-blot...) et les antigènes n'étant pas standardisés, il apparaît clairement que l'intérêt de la sérologie dépend avant tout de l'expérience propre d'une équipe habituée à un test donné [72] et pour l'instant, en raison de cette absence de standardisation, la recherche d'anticorps n'est pas recommandée en routine [73].

Des techniques génétiques d'amplification telles que la PCR ont, par ailleurs, donné des résultats encourageants pour la détection rapide des faibles inoculums de PA dans les expectorations. Plus sensible que la culture, la PCR pourrait, à condition d'être validée par des essais inter-laboratoires, s'avérer très utile en routine pour la surveillance des malades indemnes de bacille pyocyanique.

La présence de PA dans les prélèvements bronchiques d'un patient jusque là indemne de la bactérie doit toujours être considérée comme une primo-colonisation, indépendamment de critères quantitatifs. La bactérie a alors toutes les chances de s'implanter définitivement dans le poumon en l'absence d'antibiothérapie ; le portage transitoire s'avère, en effet, rarissime. On peut donc considérer comme primo-colonisé, tout patient ayant au moins un prélèvement respiratoire positif à PA dans le cadre d'un suivi bactériologique régulier.

La colonisation chronique se traduit, quant à elle, par l'isolement régulier de PA dans les expectorations. On peut retenir le principe que trois résultats positifs successifs au cours d'un suivi mensuel ou bi-mensuel signent le passage à la chronicité, quelle que soit la charge bactérienne. Le développement de colonies muqueuses à partir d'un prélèvement unique ou la présence de plus d'un arc de précipitine en immuno-électrophorèse bi-dimensionnelle peuvent aussi être considérés comme des critères objectifs de chronicité.

Les délais entre la primo-colonisation et l'aggravation des signes pulmonaires restent assez mal connus en raison, notamment, de la difficulté à déceler les faibles inoculums dans le poumon profond et des effets délétères inconstants de la bactérie sur les muqueuses respiratoires. Il est fort probable que cette durée varie en fonction de facteurs individuels (réactivité inflammatoire, degré de gravité de la pathologie sous-jacente, qualité de la prise en charge médicale, environnement...) et de facteurs bactériens (niveaux de production de divers facteurs de virulence). En général, l'aggravation des signes respiratoires va de pair avec une augmentation des inoculums bactériens dans le poumon, une intensification de la réaction inflammatoire locale et de la réponse immunitaire.

La primo-colonisation bronchique et le passage à la mucoïdie sont deux événements qui doivent être clairement identifiés dans la mucoviscidose. Une détection précoce de la contamination des voies aériennes par PA peut permettre, en effet, l'instauration d'une antibiothérapie efficace capable d'éradiquer transitoirement le pathogène et d'épargner le capital respiratoire du malade pendant quelques mois, voire quelques années. L'apparition du phénotype mucoïde traduit, en revanche, une implantation presque toujours irréversible de la bactérie et une réduction de l'efficacité bactéricide des agents anti-infectieux. La stratégie thérapeutique ne vise alors plus la disparition du germe mais la baisse de l'inflammation bronchique.

2.1.5. Pourquoi *Pseudomonas aeruginosa* joue-t-il un rôle prédominant dans la mucoviscidose?

Il est désormais acquis que le déficit fonctionnel des cellules épithéliales respiratoires en canal CFTR modifie les propriétés rhéologiques du mucus bronchique. La viscosité anormalement élevée de ce dernier, en réduisant l'efficacité de la clairance mucociliaire, favoriserait l'adhérence de PA aux cellules bronchiques et sa persistance dans le poumon. Cependant la composition anormale et les propriétés mécaniques des sécrétions bronchiques n'expliquent pas la propension de l'arbre bronchique CF à être colonisé par un nombre limité de bactéries et, en particulier, par *Pseudomonas aeruginosa*. Les raisons de l'extrême vulnérabilité des patients mucoviscidosiques à l'infection par PA ne sont pas élucidées en dépit de nombreuses études réalisées depuis plus de trente ans. Au fil des ans, différentes hypothèses contribuant à expliquer le rôle pathogène prédominant de PA dans la mucoviscidose ont été émises. Celles-ci sont résumées sur la figure 8.

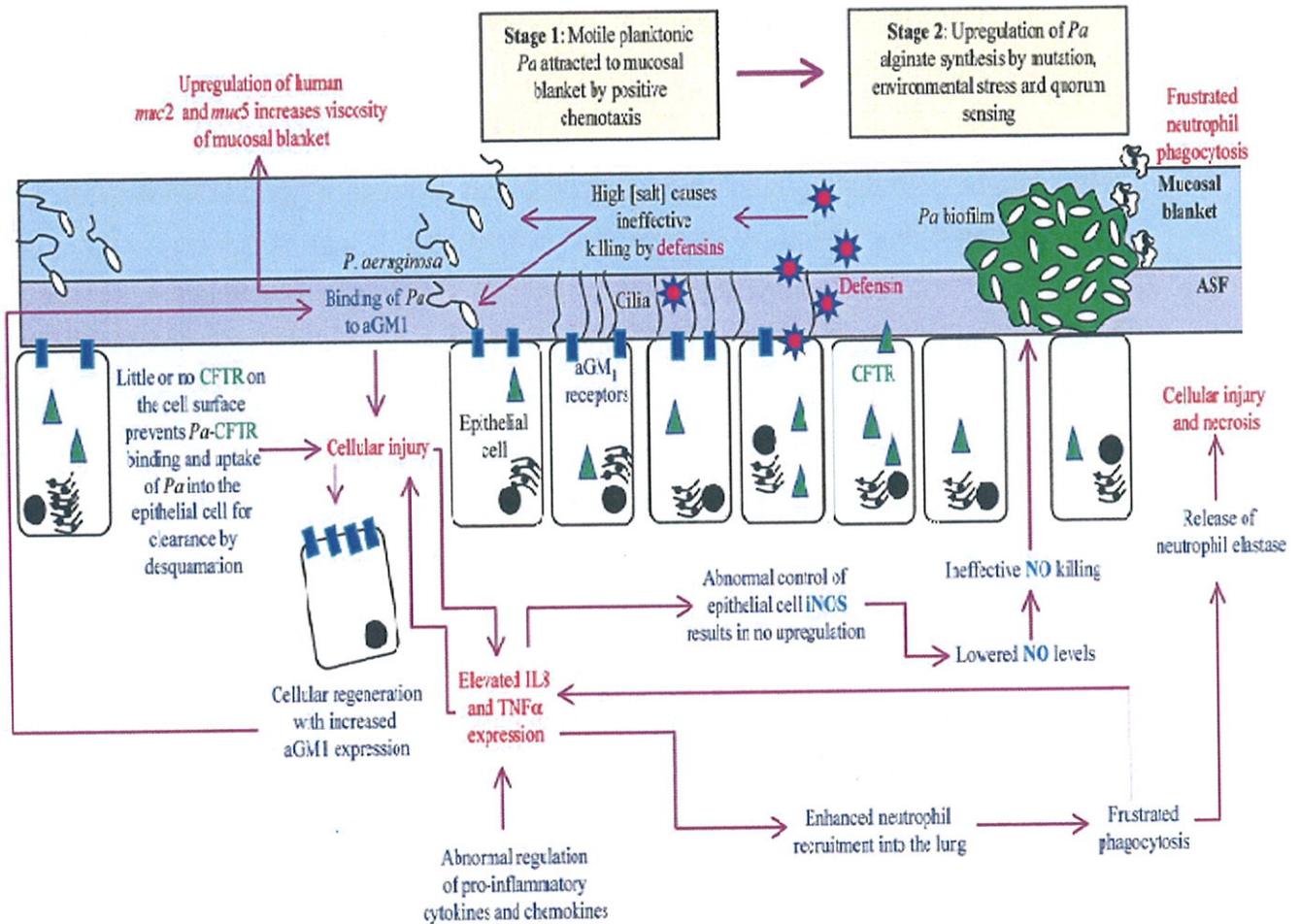


Figure 8 : Rôle du défaut de la fonction CFTR et implication de *P. aeruginosa* dans la colonisation. D'après : Hutchison et col. 1999 [50].

Etape 1 : attiré par le chimiotactisme des mucines de l'hôte, *P. aeruginosa* se lie au récepteur aGM1 présent à la surface de l'épithélium respiratoire. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR est à l'origine de la régulation positive de la sécrétion d'IL8 qui attire les polynucléaires neutrophiles. L'élastase des neutrophiles et les facteurs de virulence de PA provoquent des lésions de l'épithélium pulmonaire, entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement d'autres neutrophiles. La régénération de l'épithélium est à l'origine d'une surexpression de récepteurs aGM1 auxquels *P. aeruginosa* adhère. La liaison du LPS à l'aGM1 induit l'expression des gènes humains *muc*, ce qui induit une augmentation du volume de la couche de mucus. Le contenu présumé élevé en chlorure de sodium du liquide de surface de l'arbre respiratoire du patient CF induirait l'inactivation de certains peptides antimicrobiens présent dans le liquide de surface épithélial qui ne contribueraient plus à contrôler le nombre de bactéries. De plus, l'expression réduite de l'enzyme iNOS induit une faible concentration de la molécule antimicrobienne NO dans la mucoviscidose ce qui favorise la prolifération de PA. Le défaut de CFTR fonctionnel priverait l'épithélium respiratoire de l'élimination de PA qui a lieu dans les épithéliums normaux

Etape 2 : quand la masse microbienne de PA atteint un certain taux, la combinaison de mutations spontanées, de signaux induit par le quorum-sensing et du stress environnemental provoque une augmentation de la synthèse d'alginate et la formation d'un biofilm bactérien. Celle-ci entraîne une diminution de la sensibilité aux antibiotiques et une inhibition de la phagocytose, ce qui induit une dégranulation des neutrophiles et des lésions inflammatoires.

a) Caractéristiques du poumon mucoviscidosique favorisant l'implantation et l'infection à PA

- Faible volume du liquide de surface de l'arbre respiratoire [75] et défaillance de la clairance mucociliaire

Le volume du liquide de surface de l'arbre respiratoire est contrôlé chez le sujet normal par la balance entre l'absorption de sodium et la sécrétion d'anions. Chez le sujet mucoviscidosique, le défaut de CFTR a pour conséquence une abolition du transport d'anion stimulé par l'AMPc induisant une réduction de la sécrétion de chlorure. En l'absence de CFTR fonctionnel, l'activité du canal sodique épithélial ENac responsable de la réabsorption du sodium à partir du liquide de surface et normalement régulé négativement par CFTR, augmente. L'hyperabsorption de sodium et l'absence de sécrétion de chlore au niveau de l'appareil respiratoire des patients CF induisent une réduction du volume du liquide périciliaire et une détérioration de la clairance mucociliaire [76,77]. La déplétion du liquide périciliaire engendre l'adhésion du mucus aux surfaces de l'arbre respiratoire ce qui empêche son ascension vers le nasopharynx et de ce fait l'élimination des micro-organismes piégés dans le mucus [78]. De plus, le LPS de PA et les produits de l'inflammation engendrés par l'infection régulent de façon positive les gènes muc2 et muc5 codant pour les mucines respiratoires humaines [50]. La sécrétion persistante de mucines génère la formation de plaques desséchées et de bouchons de mucus, fournissant un microenvironnement favorable à l'infection bactérienne. La « sécheresse » et l'hypoxie régnant au sein de ces plaques et bouchons de mucus semblent promouvoir la croissance bactérienne de PA sous forme de biofilm.

- Une adhésion facilitée dans le poumon CF

Les souches de PA adhèrent de façon plus importante, par l'intermédiaire de leurs pili, aux cellules épithéliales des patients CF qu'aux cellules « normales » [23].

Les mutations CFTR sont à l'origine d'un défaut de sialylation des glycoconjugués situés au niveau de la membrane apicale, qui pourrait être lié à l'hyperacidification de l'appareil de Golgi dans les cellules épithéliales CF [79]. Or les pili de PA, et la bactérie toute entière, se lient à l'asialoganglioside-1 (aGM1) et non à la forme sialylée du ganglioside-1 [79]. L'élévation du taux d'asialoganglioside-1 est effective dans les cellules CF [80] et dans les

régions de régénération de l'épithélium qui sont favorisées par l'inflammation chronique de l'arbre bronchique au cours de la mucoviscidose [81].

Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'asialo-GM1 constituerait un récepteur significatif pour PA est réfutée par d'autres investigateurs [82]. En effet, la liaison à ce récepteur n'est pas spécifique de PA, et des autopsies ont montré que PA est plus souvent retrouvé au niveau de la couche de mucus qu'adhérant à la surface des cellules épithéliales [50].

Les héparanes sulfates protéoglycanes situés à la surface basolatérale des cellules épithéliales seraient des récepteurs potentiels pour les souches de PA dénuées de pili, chez les patients présentant des lésions au niveau de l'épithélium de l'arbre bronchique [83].

- Une élimination défavorisée par le déficit fonctionnel de CFTR

Selon une hypothèse assez controversée, les cellules épithéliales normales « piègeraient » PA en le phagocytant par l'intermédiaire du canal CFTR dont le ligand serait représenté par le LPS de PA [84]. La desquamation de ces cellules vouées à la mort assurerait du même coup l'élimination de PA. Les patients atteints de mucoviscidose ne pourraient donc pas bénéficier de ce mécanisme pour lutter contre l'invasion par ce germe. Cette hypothèse est cohérente avec diverses études chez des souris transgéniques [85,86].

- Défaillance de l'immunité naturelle

L'immunité naturelle constitue la première ligne de défense contre l'infection de l'arbre respiratoire, en association avec la clairance mucociliaire.

- Faible niveau d'expression de l'oxyde nitrique [75]

Le niveau d'expression d'oxyde nitrique (NO), qui présente une activité cytolytique et cytostatique sur les bactéries, est plus faible chez les patients mucoviscidosiques ce qui est lié à une expression réduite d'une synthétase inductible : iNOS (inducible nitric oxide synthase) dans la mucoviscidose ; cette enzyme est normalement présente dans les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales.

- Déficit fonctionnel de canal CFTR et défaillance de l'immunité innée

Le canal CFTR constitue un récepteur reconnaissant les antigènes ou Pattern recognition molecules (PRM), qui extrait le LPS de la membrane externe de PA ce qui induit la translocation nucléaire de NF- κ B. NF- κ B est un facteur activant la transcription de nombreux gènes de la réponse inflammatoire induisant une réponse inflammatoire immédiate concourant au déclenchement de l'immunité acquise. Dans la mucoviscidose, l'absence d'activité PRM, liée à l'absence ou à la non fonctionnalité de CFTR, compromet la capacité de l'épithélium pulmonaire à orchestrer une réponse immunitaire innée efficace contre l'infection à PA [87].

- Moindre efficacité des peptides cationiques antibactériens au cours de la mucoviscidose [23]

Des protéines ou des peptides (lysozyme, lactoferrine, phospholipase A2, protéines surfactantes, alpha et bêta-défensines), sécrétés dans le liquide de surface par les muqueuses respiratoires ou par des composants cellulaires participant à l'immunité naturelle, ont la capacité de détruire un large spectre de bactéries et de moduler la réponse inflammatoire. Il n'existe pas d'argument en faveur d'un défaut de production de ces peptides antimicrobiens dans la mucoviscidose. Par contre, il a été suggéré que le contenu présumé élevé en chlorure de sodium du liquide de surface de l'arbre respiratoire mucoviscidosique induirait l'inactivation de certains peptides antimicrobiens ce qui permettrait la colonisation bactérienne initiale [88,89]. Peu de données expérimentales *in vivo* confirment cette théorie.

- Inefficacité de la réponse immune acquise

Bien que les patients atteints de mucoviscidose ne présentent pas de déficit immunitaire, l'élimination de PA au niveau de l'appareil respiratoire est impossible dans la plupart des cas. L'inefficacité de la réponse immune acquise est une conséquence de la réduction de l'opsonophagocytose due au clivage protéolytique du complément et du récepteur Fc, lié à l'inflammation de l'arbre bronchique des patients CF [90]. De plus, la destruction cellulaire locale et la clairance mucociliaire réduite diminuent l'efficacité de la réponse immune dans l'élimination de PA. Enfin, l'exposition chronique des antigènes de PA chez les patients CF contribuerait à un défaut dans la maturation de l'avidité des anticorps anti-PA d'où une diminution de l'élimination de ce germe [91].

b) Caractéristiques de PA contribuant à l'infection initiale et à sa persistance

Pour s'implanter et survivre dans les voies respiratoires, malgré la présence des défenses de l'hôte, et d'évènements répétés d'antibiothérapie topique et systémique, *P. aeruginosa* devra développer une importante gamme de stratégies immuno-invasives. Ainsi, la pathogénie de PA est attribuée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires, qui entraînent la destruction permanente des cellules de l'hôte et induisent une libération régulière de médiateurs pro-inflammatoires, aboutissant à un véritable cercle vicieux aggravant la maladie respiratoire chronique et favorisant les exacerbations. Ces facteurs de virulence, pour la plupart extracytoplasmiques, sont hautement induits par des facteurs environnementaux, par le système du quorum sensing et par d'autres facteurs de régulation tels que les facteurs de régulation transcriptionnelle sigma de type ECF (Extra-Cytoplasmic Function).

De plus, bien que la plupart des patients mucoviscidosiques soient colonisés par un seul ou un faible nombre de génotypes, la mise en évidence de différents morphotypes de *Pseudomonas aeruginosa* incluant des souches « classiques », des souches mucoïdes, et des variants à petites colonies est fréquente au cours de la mucoviscidose. La diversité phénotypique résulte de la sélection de certaines souches au sein de niches spécialisées. L'apparition de ces différents morphotypes pourrait être facilitée par l'hypermutableté de souches de PA, cette propriété étant fréquente au cours de la mucoviscidose.

- Facteurs d'adhésion et de virulence de PA

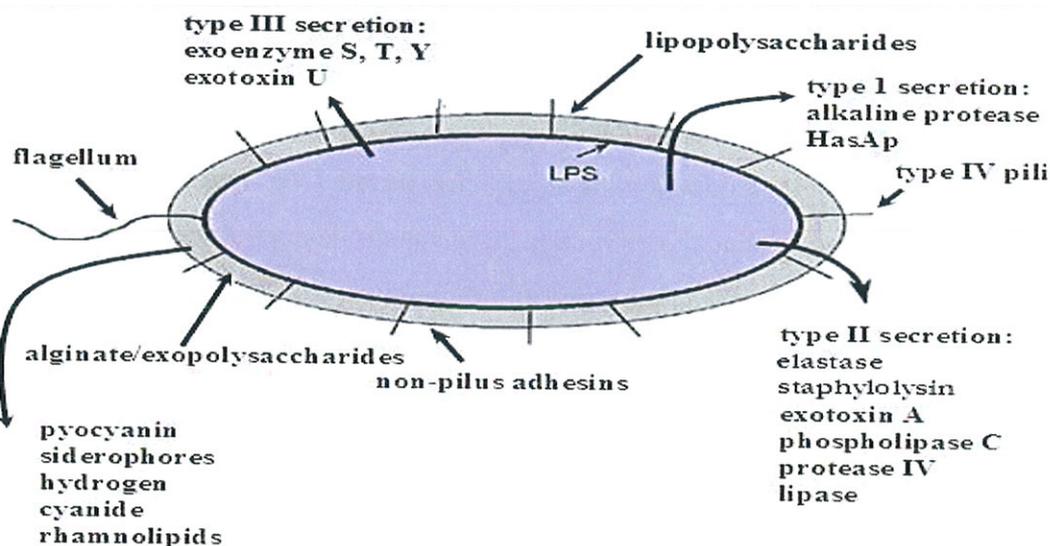


Figure 9 : Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, adapté de Van Delden et col.1998 [92].

Parmi les composés intervenant dans la virulence de PA, on différencie des facteurs intimement liés à la cellule bactérienne facilitant l'adhésion et des facteurs de virulence relargués par le pathogène (figure 9).

Différents facteurs bactériens participent à l'installation du pathogène sur l'épithélium bronchique. Parmi les facteurs favorisant l'adhésion, se trouvent le flagelle permettant un rapprochement vers les cellules de l'hôte, des adhésines (pili de type IV) permettant un contact intime avec les cellules épithéliales, des lectines permettant l'ancrage sur les mucines bronchiques [93].

P. aeruginosa sécrète de nombreux facteurs de virulence extracellulaires parmi lesquels on peut citer des enzymes tels que les élastases A et B, qui sont des métalloprotéases dégradant l'élastine, redoutables par leur forte capacité destructrice parenchymateuse, des protéases, la collagénase, les rhamnolipides qui sont des biosurfactants qui dissolvent les phospholipides pulmonaires par dégradation des lipides et de la lecithine, la phospholipase C, la neuraminidase qui par son action, expose de nouveaux sites de fixation au sein des glycolipides membranaires et des cytotoxines, responsables de la mort tant des cellules épithéliales que des cellules de défense de l'hôte (macrophages et PNN). L'exotoxine A (ExoA), constitue un facteur de virulence majeur. Sécrétée par la voie de sécrétion de type II, cette protéine est une toxine ADP-ribosylante qui entre dans la cellule via le système d'endocytose par un récepteur encore inconnu. Dans le cytoplasme de la cellule hôte, ExoA

inhibe la synthèse protéique et est responsable de dommages tissulaires, de l'invasion bactérienne et d'une activité immunosuppressive.

La virulence de *P. aeruginosa* repose également sur la sécrétion d'exotoxines via le système de sécrétion de type III (TTSS). Le TTSS est un système de virulence permettant à la bactérie de transloquer, directement dans le cytosol des cellules cibles, des effecteurs cytotoxiques. Le TTSS de PA comporte quatre protéines effectrices : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. L'exoenzyme S (ExoS) inhibe la motilité des cellules phagocytaires et induit la mort des PNN et des macrophages. L'exoenzyme U (ExoU) est connue pour avoir une activité lytique sur les cellules eucaryotes [78].

Enfin, la sécrétion de pyoverdine et de pyocheline, qui sont des sidérophores chélatant le fer, permet à PA de capter le fer des transferrines, des ferritines, de l'hémoglobine et d'autres protéines de l'hôte contenant du fer. La pyocyanine, un autre chromophore de *P. aeruginosa*, est toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes.

La production d'un grand nombre de facteurs de virulence extracellulaires est contrôlée par un système densité-dépendant (quorum-sensing) permettant une production coordonnée de ces facteurs par la totalité de la population bactérienne.

La destruction permanente de cellules de l'hôte induit une libération régulière de médiateurs variés pro-inflammatoires, qui entretient le cercle vicieux caractéristique de la maladie, et favorise les épisodes d'exacerbations [93].

Ces facteurs de virulence ne contribuent aux lésions pulmonaires qu'au cours des premiers mois de l'infection. Plus tard, la réponse immunitaire s'organise et les protéases bactériennes libres ne sont plus détectables dans les sécrétions bronchiques. Les lésions inflammatoires, qui continuent à se développer, seraient alors en partie liées à la présence in situ de complexes immuns, qui activent la voie du complément, donc le chimiotactisme et l'inflammation avec la libération d'histamine (polynucléaires basophiles), de sérotonine (plaquettes) et de protéases (polynucléaires neutrophiles) [94].

- Conversion phénotypique des isolats et émergence de souches mucoïdes

Les premières descriptions de l'association entre les souches mucoïdes de PA et la colonisation pulmonaire chronique des patients mucoviscidosiques sont apparues dans les années 1960.

Au début de la colonisation, les souches de PA sont proches des souches environnementales d'un point de vue phénotypique dans la mesure où elles sont relativement sensibles aux antibiotiques, et sont de morphologie non mucoïde. Après un certain délai, les isolats de PA vont acquérir des caractéristiques particulières : apparition de résistances aux antibiotiques et du caractère mucoïde [58].

La conversion phénotypique vers la mucoïdie résulte de l'apparition de bactéries mutantes capables de sécréter des quantités considérables d'un exopolysaccharide visqueux : l'alginate. L'alginate est un co-polymère, sans répétition, de β -D-mannuronate (M) et de son C-5 épimère, le α -L-guluronate (G), relié par un pont glycosidique 1 \rightarrow 4 (polymère de β -D-mannuronate- α -L-glucuronate).

Ce polysaccharide donne aux colonies en culture un aspect muqueux et filant très instable in vitro. Ce caractère mucoïde est indépendant du sérotype et est pratiquement spécifique de l'affection mucoviscidosique.

L'incidence des souches mucoïdes augmente avec l'âge et l'évolutivité de la maladie respiratoire, et jusqu'à 90% des sujets en fin d'évolution de mucoviscidose sont colonisés par des souches muqueuses.

Le passage à la mucoïdie s'accompagne généralement de la perte d'un certain nombre de facteurs de virulence devenus inutiles pour la bactérie (perte de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) rendant les souches non typables, perte de mobilité dépendante des flagelles et pili, perte de la production de pyocyanine et d'exoenzymes, de l'activité oxydasique...), ce qui ne facilite pas l'identification de ces souches [95].

○ Génétique de la synthèse d'alginate

La majorité des gènes intervenant dans la synthèse de l'alginate ou dans sa régulation sont organisés en trois clusters principaux situés approximativement à 9, 34, et 68 minutes sur le chromosome de *P. aeruginosa*.

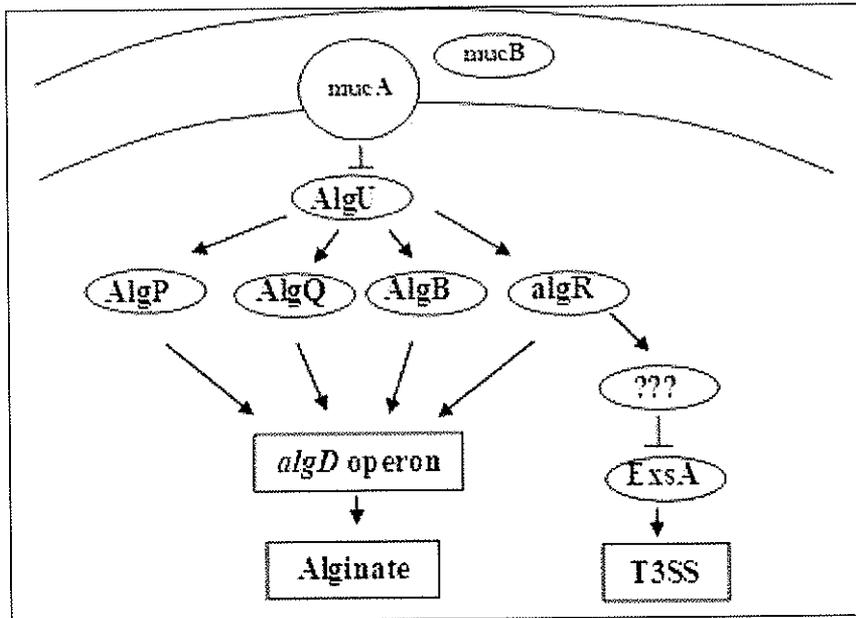


Figure 10 : Modèle proposé pour la production de l'alginate régulée par la protéine MucA . D'après Wu et col. 2004. [96].

Les gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse de l'alginate forment un opéron (opéron *algD*) situé à 34 min dont l'expression est sous le contrôle de nombreux régulateurs situés dans l'opéron *algU* (situé à 68 min) qui comporte 5 gènes *algU-mucAmucB-mucC-mucD* (figure 10). Le gène *algU* code un facteur sigma (σ^{22}) régulant sa propre transcription et celle de plusieurs autres gènes impliqués dans la synthèse de l'alginate. AlgU est nécessaire pour l'expression des protéines AlgP, AlgQ, AlgB et AlgR dont les gènes sont situés à environ 9 min. Ces protéines activatrices permettent l'expression optimale de l'opéron *algD* codant les enzymes de la synthèse d'alginate. Le second gène de l'opéron, *mucA*, code une protéine transmembranaire dont la portion intracytoplasmique lie AlgU et l'inactive. Le gène *mucB* code une protéine périplasmique et jouerait un rôle de senseur des signaux de l'environnement. Lors d'un stress extracellulaire (osmolarité élevée, présence de glycoprotéines anormales retrouvées dans la mucoviscidose), MucB transmet un signal à MucA et permet la libération du facteur sigma AlgU ce qui induit l'activation de la production d'alginate (figure 10) [96].

Des études ont montré que les isolats mucoïdes de PA issus de patients CF présentaient des mutations dans le gène *mucA* : une première étude portant sur des isolats de 53 patients a mis en évidence un taux de mutations dans le gène *mucA* de 84% [97], et une deuxième étude réalisée en Australie a quant à elle trouvée un taux de 44% [98]. Les mutations dans le gène *mucA* empêchent la liaison de MucA à AlgU permettant à AlgU d'initier la transcription de *algD* et par voie de conséquence la synthèse d'alginate. La mutation dans le gène *mucA* pourrait être induite par les radicaux libres et l'élastase produits par des PNN actifs (polynucléaires neutrophiles). D'autre part, des mutations dans le gène *mucB* induisent la conversion phénotypique de PA en forme mucoïde [96].

La synthèse d'alginate dépend également du régulateur de transcription codé par *algR*, qui se lie par l'intermédiaire de trois sites au promoteur du gène *algD*, ce qui induit l'activation de la transcription de ce dernier. *algR* joue également un rôle dans la pathogénicité de PA : en effet, des souches mutées au niveau de ce gène montrent une virulence moindre. De plus, ce gène est nécessaire pour la mobilité par « twitching » mettant en jeu les pili de type IV, et la protéine AlgR est nécessaire pour l'inhibition de la transcription des gènes codant pour le système de sécrétion de type III [96,99].

○ Biosynthèse des alginates

La biosynthèse des alginates s'effectue en deux temps [79,94]. Le premier temps, non spécifique, utilise une voie secondaire du métabolisme de glucose, la voie d'Enter-Doudoroff et permet l'obtention du fructose 6-phosphate, précurseur de la seconde partie. Le deuxième temps, spécifique, utilise des enzymes spécialement induites pour la fabrication des exopolysaccharides (figure 11).

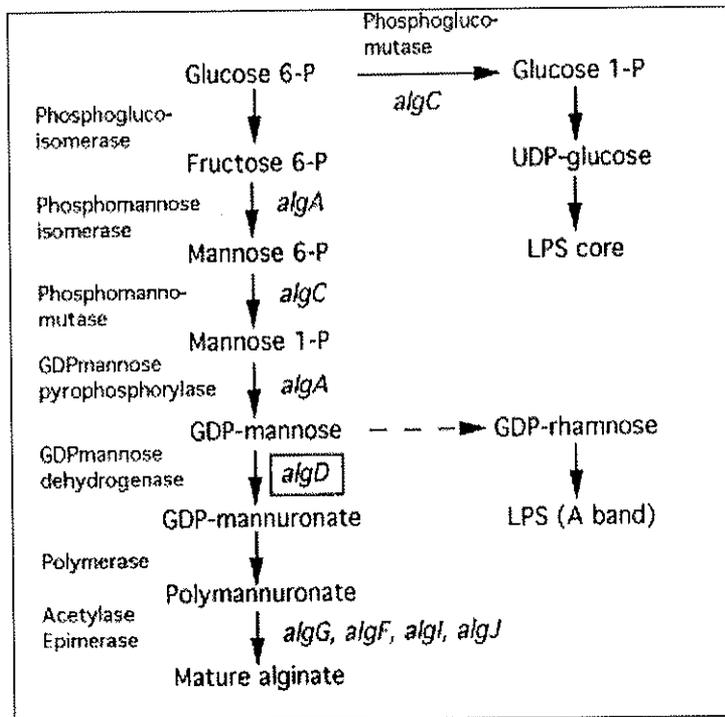


Figure 11 : Biosynthèse de l'alginate. D'après Govan et col. 1996 [79].

Les étapes de biosynthèse [79] débutent par la conversion du fructose-6-phosphate en mannose-6-phosphate par la phosphomannose isomérase (PMI). La PMI est codée par le gène de structure *alg A*, localisé dans le cluster à 34 minutes, dont le produit est une protéine bifonctionnelle de 53 kDa. Ainsi, le gène *alg A* code également la troisième enzyme, la GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) qui catalyse la formation du GDP-mannose par fixation d'un GTP sur le mannose-1-phosphate. Les activités enzymatiques respectives sont localisées dans 2 domaines différents de la protéine. La phospho-manno-mutase (PMM) intervient dans la deuxième étape en catalysant la conversion du mannose-6-phosphate en mannose-1-phosphate. Cette protéine de 51 kDa est codée par le gène *algC*. Le gène *algC* intervient également dans la synthèse du core du LPS en codant pour la phosphoglucosylmutase qui catalyse la formation de glucose-1-P à partir du glucose-6-P.

La PMI, la PMM et la GMP sont aussi impliquées dans le métabolisme général des glucides car les produits qu'elles synthétisent sont substrats dans d'autres chaînes de biosynthèse de polysaccharide (LPS et rhamnolipides).

La GDP-mannose déshydrogénase (GMD), dernière enzyme cytoplasmique connue de la chaîne de biosynthèse, est spécifique de la biosynthèse de l'alginate et catalyse la double oxydation du GDP-mannose en GDP-mannuronate avec la réduction de 2 NAD⁺. Cette enzyme est codée par le gène *alg D* et n'est exprimée que chez les souches mucoïdes.

La dernière étape consiste en l'incorporation des résidus GDP-mannuronates en polymères d'alginate, en la maturation et l'exportation de ces polymères vers le périplasme suivies de leur excrétion.

○ Origine des souches mucoïdes

Pendant de nombreuses années, il a été admis que l'apparition de souches mucoïdes résultait de la conversion phénotypique de souches non mucoïdes de *P. aeruginosa* colonisant le poumon, en l'absence d'argument scientifique réfutant l'hypothèse alternative d'une colonisation de novo par des formes mucoïdes. Il arrive que la première souche de PA isolée de patients CF soit mucoïde, ce qui pourrait faire penser que cette souche pourrait provenir d'une colonisation primaire. Cependant, en l'absence de réservoir environnemental pour les souches mucoïdes de PA, la colonisation primaire nécessiterait une infection croisée entre des patients CF. Ce mode d'acquisition se produit indubitablement, mais est limité à des contacts rapprochés et fréquents, chez des patients appartenant à la même famille, par exemple. Les souches mucoïdes peuvent se convertir en souches non mucoïdes de façon spontanée ce qui montre leur relation directe. Des données épidémiologiques reposant sur le sérotypie, la lysotypie et la pyocinotypie ont confirmé la relation de clonalité entre les souches à l'origine de la colonisation initiale et leurs dérivés mucoïdes [100].

La durée entre la colonisation initiale et la conversion en forme mucoïde est variable. Dans une des premières études décrivant l'association entre les formes mucoïdes de PA et la mucoviscidose, Doggett et col. ont rapporté que chez la majorité des patients suivis, 3 à 10 mois s'écoulaient entre la première culture positive pour PA et la détection des souches mucoïdes [79]. Une autre étude a trouvé une durée moyenne de 3,37 ans [101]. Selon Govan et Nelson, la conversion pourrait se produire en environ 3 mois [79].

Enfin, une étude prospective portant sur 56 patients diagnostiqués à la naissance et suivis pendant 16 années a mis en évidence un âge médian respectivement de 1 an et de 13 ans pour l'acquisition d'une souche non mucoïde de PA et l'apparition de souches mucoïdes, la durée moyenne de la conversion phénotypique étant de 10,9 ans [102].

La variabilité du temps d'apparition des souches mucoïdes est en accord avec le risque d'apparition de la mutation à l'origine de la conversion en phénotype mucoïde qui est suivie de la sélection des souches mucoïdes dans l'environnement du poumon CF. En effet, les mutations spontanées à l'origine de la mucoïdie se produisent à une fréquence de 10^{-7} .

Face à ce faible taux de mutations, l'avantage sélectif conféré par la mucoïdie doit être conséquent [79].

- Rôle pathogène de l'alginate [79]

Le rôle pathogène connu ou supposé de l'alginate sous la forme d'une couche mucoïde enrobant les bactéries ou bien en tant qu'une substance libre peut être classé en trois catégories : rôle de barrière envers les cellules phagocytaires et l'opsonisation, rôle d'immunomodulation, et rôle dans la formation du biofilm.

Il a été établi que la présence de souches muqueuses est corrélée à une plus grande sévérité des signes respiratoires, en raison de l'augmentation de la viscosité et du volume des expectorations, mais aussi d'effets multiples du polysaccharide sur l'inflammation. Les patients qui n'acquièrent pas de souches mucoïdes au niveau respiratoire, (mais qui peuvent présenter des souches non mucoïdes), présentent une meilleure fonction pulmonaire que les patients présentant des souches mucoïdes [78].

L'apparition de souches mucoïdes traduit donc un passage à la chronicité d'autant plus irréversible que l'activité bactéricide des antibiotiques se réduit considérablement au même moment. Le consensus actuel est de détecter au plus tôt la primocolonisation à la période où l'éradication est encore possible et de mettre en place une antibiothérapie précoce au moment de l'acquisition de ce germe pour éviter ou retarder sa conversion phénotypique en réduisant le réservoir microbien à partir duquel les variants mucoïdes apparaissent.

- Variants à petites colonies

Des variants à petites colonies (SCV : small colony variants) ou colonies naines de PA, caractérisés par une croissance lente, peuvent être isolés du poumon mucoviscidose. Ces variants ont été moins étudiés que le morphotype mucoïde et il n'existe pas, à notre connaissance, de données concernant leur prévalence dans la mucoviscidose. L'apparition de ces SCV semble être corrélée à une détérioration de la fonction pulmonaire et à l'utilisation d'aérosols d'antibiotiques. Les isolats SCV présentent une plus grande résistance aux antibiotiques que les isolats « classiques ». Parmi le groupe hétérogène des isolats SCV, certaines souches présentent une capacité d'autoaggrégation, et une hyperpiliation, ainsi qu'une mobilité plus importante par « twitching », un meilleur développement au cours de la

phase stationnaire de croissance, une plus grande capacité à former des biofilms et une adhésion plus importante aux cellules pulmonaires que les souches isogéniques présentant le morphotype classique [103,104]. Après plusieurs passages sur des milieux riches, les isolats SCV peuvent donner des morphotypes à croissance rapide qui diffèrent des morphotypes classiques dans la mesure où ils conservent certaines propriétés des isolats SCV (capacité à former des biofilms, hyperexpression des pili de type IV) [103].

D'après l'étude de von Götz et col. [105], certains isolats SCV hyperpiliés et autoaggrégants présentent une virulence plus importante que celle présentée par les morphotypes « classiques », ce qui semble être lié à une augmentation de l'expression du système de sécrétion de type III. **Ainsi, les isolats SCV pourraient avoir un impact sur le pronostic ; il est donc primordial de les détecter au laboratoire et de mentionner leur éventuelle présence.**

- Organisation en biofilm

Alors que la croissance de PA sous forme de microcolonies a été proposée depuis longtemps, l'hypothèse de l'existence de biofilms dans la mucoviscidose a été récemment soumise. Les biofilms correspondent à des communautés sessiles de bactéries, formant des agrégats sur les surfaces, en utilisant une matrice polymérique qu'elles synthétisent elles-mêmes [23].

L'architecture du biofilm est constituée de microcolonies, engainées dans des exopolysaccharides d'alginate, qui se structurent en forme de champignons ou de piliers séparés par des canaux aqueux, qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets. La matrice d'exopolysaccharide (alginate) représente quelque 85 % du volume total. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité [106]. De l'ADN et des mucines pulmonaires de l'hôte sont également trouvés dans ce biofilm. Ce dernier peut atteindre un diamètre de 60 μm [50].

Trois étapes peuvent être distinguées dans la formation des biofilms [106] (voir figure 12). L'étape initiale consiste en l'attachement des bactéries planctoniques à la phase gélifiée du fluide recouvrant l'épithélium respiratoire, et fait intervenir des appendices générateurs de mouvement (flagelles), qui permettent d'approcher la surface à coloniser. Les bactéries se déplacent ensuite sur la surface selon un mode de déplacement de type *twitching*, grâce à

l'extension et à la rétraction du pilus. Cette approche permet un attachement transitoire. Cette étape d'attachement est suivie d'une deuxième étape de prolifération aboutissant à la formation de microcolonies faisant intervenir les pili de type IV ; au cours de cette deuxième étape une association stable avec la surface ou avec d'autres micro-organismes s'établit. Enfin, la dernière étape consiste en une étape de différenciation et structuration du biofilm avec la formation de canaux aqueux, de pores et de structures ressemblant à des tours et des champignons. Des fragments ainsi que des cellules planctoniques sont relâchés de la surface du biofilm mature pour permettre sa dispersion.

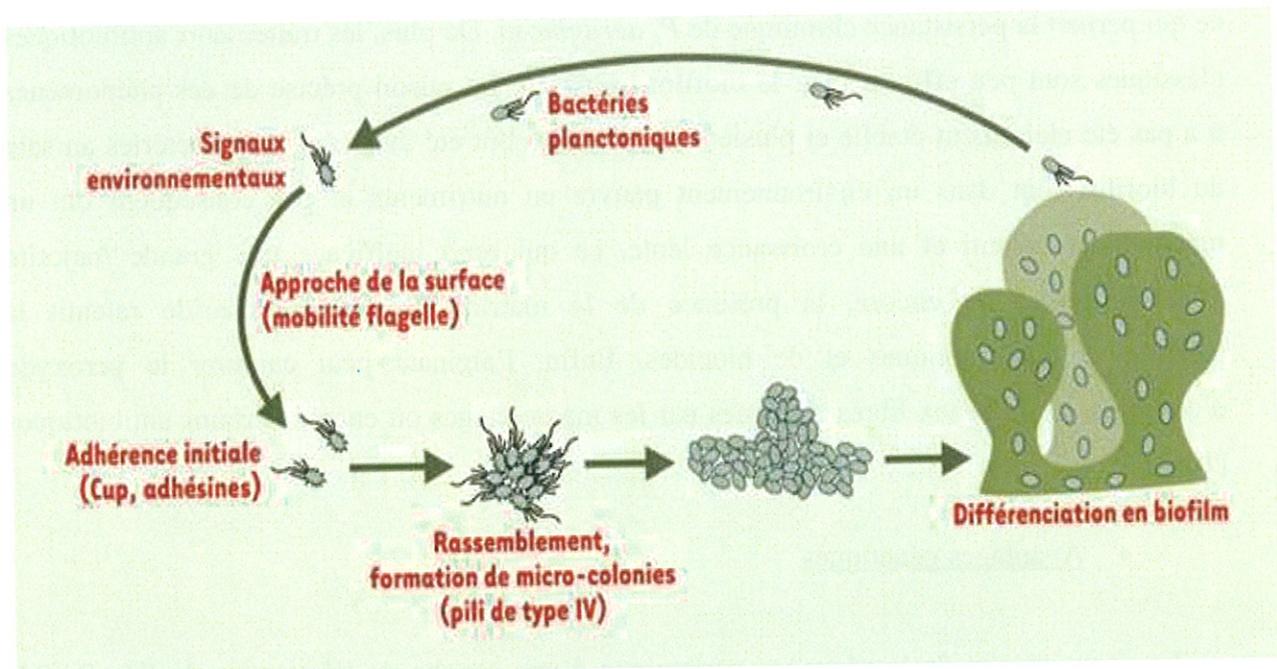


Figure 12 : Cycle de formation du biofilm bactérien chez *P. aeruginosa* . (d'après Filloux et Vallet, 2003 [106])

La formation du biofilm est contrôlée par un mécanisme de quorum sensing, qui constitue un mode de communication entre les bactéries, basé sur l'utilisation de molécules de signal qui permet aux bactéries de coordonner leur comportement. Ce système est fondé, chez les bactéries à Gram négatif, sur la production de phéromones diffusibles, des acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces molécules diffusent à travers l'enveloppe cellulaire bactérienne et, lorsque leur concentration atteint un certain seuil, elles provoquent l'activation d'un régulateur transcriptionnel qui va alors déclencher ou diminuer l'expression de gènes cibles. Ainsi, au cours de l'étape de différenciation du biofilm, l'expression des gènes codant pour

PilA, la sous-unité structurale du pilus de type IV, FliC, la sous-unité structurale du flagelle, et CupAI, une sous-unité de type *fimbriae*, diminue, et la synthèse d'alginate est favorisée.

L'hypoxie locale au sein des plaques muqueuses induit une augmentation de la production d'alginate par PA, ce qui a pour conséquence la croissance du biofilm [106].

La formation du biofilm est un facteur de résistance face à la réponse immunitaire de l'hôte. Le biofilm empêche la fixation des anticorps spécifiques, protège contre la phagocytose et l'opsonisation, inhibe l'attachement des cellules immunitaires, nuit à la chimiotaxie des leucocytes, et favorise l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales ce qui permet la persistance chronique de *P. aeruginosa*. De plus, les traitements antibiotiques classiques sont peu efficaces sur le biofilm bactérien. La raison précise de ces phénomènes n'a pas été clairement établie et plusieurs hypothèses ont été avancées. Les bactéries au sein du biofilm sont dans un environnement pauvre en nutriments et par conséquent ont un métabolisme ralenti et une croissance lente, ce qui rend inefficace une grande majorité d'antibiotiques ; ou encore, la présence de la matrice d'exopolysaccharide ralentit la pénétration d'antibiotiques et de biocides. Enfin, l'alginate peut capturer le peroxyde d'oxygène, les radicaux libres relargués par les macrophages ou encore certains antibiotiques [106].

- Avantages génétiques

La connaissance de la séquence génomique d'une souche de laboratoire de PA, PAO1, permet de mieux comprendre la versatilité et les capacités d'adaptation de *P. aeruginosa*. Cet organisme possède un génome de 6,3 Mbp, 37% plus important que celui de *E. coli* qui est le plus connu jusqu'ici. La complexité génétique de PA approche celle d'un organisme eucaryote tel que *Saccharomyces cerevisiae*. Ce génome offre une formidable capacité d'adaptation à de multiples environnements, incluant l'appareil respiratoire CF. Une fréquence élevée d'hypermutableté a été identifiée parmi les isolats de PA de patients CF, ce qui est certainement lié au nombre élevé d'organismes, à la compartimentalisation de l'infection, aux défenses de l'hôte inefficaces et à la pression sélective de l'antibiothérapie continue. L'apparition de ces mutants hypermutateurs dans le poumon apparaît comme un facteur susceptible d'accélérer fortement l'émergence de bactéries mieux adaptées aux multiples agressions infligées par l'antibiothérapie et le système immunitaire [23].

- Sensibilité aux antibiotiques

Les traitements antibiotiques récurrents peuvent expliquer le fait que PA supplante les autres pathogènes à l'origine des infections préalables en raison de la résistance naturelle de ce germe à certains antibiotiques. La résistance naturelle est liée à la production d'une céphalosporinase chromosomique inductible par les aminopénicillines et les céphalosporines de 1^{ière} et 2^{ième} génération, couplée à une imperméabilité plus ou moins marquée et à un système d'efflux actif constitutif.

Les antibiotiques actifs sur le bacille pyocyanique appartiennent exclusivement à trois familles : les bêtalactamines, les aminosides et les fluoroquinolones ; deux molécules sont également actives : la fosfomycine et la colistine.

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe (modification des porines), une excrétion excessive des antibiotiques grâce à des pompes à efflux ou à la production d'enzymes inactivantes. Ces mécanismes peuvent coexister et conjuguer ainsi leurs effets.

Une étude sur cinq ans [107] de 1998 à 2002 et portant sur 4293 patients porteurs de PA a mis en évidence une incidence de l'infection par des souches multirésistantes de PA de 1,8% par an. D'après cette même étude, les facteurs de risque indépendants pour l'acquisition de telles souches incluent le diabète, l'utilisation à long terme de tobramycine par inhalation, les exacerbations de la maladie pulmonaire nécessitant des hospitalisations et l'usage d'antibiotiques par voie IV.

2.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia a été isolé pour la première fois dans un liquide pleural par J. L. Edwards en 1943 au Royaume-Uni et fut alors nommé *Bacterium bookeri*. Le premier isolement de cette bactérie au sein de prélèvements respiratoires de patients mucoviscidosiques a été réalisé au Danemark en 1975 par Frederiksen et col. [108].

Le genre *Stenotrophomonas* est classé dans la famille des *Xanthomonadaceae* (ordre des *Xanthomonadales*, classe des *Gammaproteobacteria*) et comporte à ce jour quatre autres espèces.

La systématique de *S. maltophilia*, seule espèce d'intérêt médical et vétérinaire, a fait l'objet de controverses. Anciennement nommé *Pseudomonas maltophilia* (1960-1961) par Hugh et Ryschenkov, puis *Xanthomonas maltophilia* (1983) par Swings et col., elle est enfin appelée *Stenotrophomonas maltophilia* (1993) par Palleroni et Bradbury [108].

S. maltophilia constitue aujourd'hui la quatrième espèce bactérienne la plus fréquemment isolée dans la mucoviscidose. La pathogénicité de cette bactérie dans la mucoviscidose, les facteurs de risque prédisposant à une colonisation ou une infection, les mécanismes d'acquisition de résistance aux antibiotiques, ainsi que le mode de transmission de ce germe ne sont pas encore complètement définis.

Le fait que cette bactérie présente une augmentation de son incidence dans la mucoviscidose, une multirésistance aux antibiotiques et un rôle pathogène indéniable dans les pathologies autres que la mucoviscidose, explique l'intérêt de la communauté médicale à son égard.

La situation actuelle est d'autant plus inquiétante que l'on constate l'émergence de souches multirésistantes y compris au triméthoprime-sulfaméthoxazole, habituellement proposé dans le traitement des infections à *S. maltophilia*.

2.2.1. Habitat et pouvoir pathogène

S. maltophilia est une bactérie ubiquiste retrouvée au sein de divers environnements et régions géographiques incluant l'Antartique et occupant des niches écologiques à l'intérieur et à l'extérieur de l'hôpital. Cette espèce est présente dans le sol, les végétaux (blé, canne à sucre, tournesol, betterave, orchidées...) et diverses sources d'eau (eaux de surface, puits, eaux usées, eau en bouteille). Elle a été également isolée à partir de lait cru de vache et de brebis, de lait pasteurisé, d'aliments réfrigérés... A l'hôpital, sa présence a été mise en évidence à différents niveaux (tube de prélèvement de sang, piscine d'hydrothérapie, solutions désinfectantes, nébuliseurs, machine de dialyse, mains du personnel soignant...) [108-110].

Chez l'homme sain, cette espèce peut être isolée des fèces, de la gorge ou des mains, mais le portage semble peu fréquent.

Chez l'animal, *S. maltophilia* a été mis en évidence chez des poissons, dans les fèces de lapins, de lézards et de grenouilles, dans le cloaque des serpents et dans l'intestin des rongeurs de laboratoire [108].

Considéré dans un premier temps comme un commensal inoffensif, *S. maltophilia* est désormais reconnu comme un pathogène opportuniste, dont le spectre des manifestations cliniques ne cesse de se diversifier, et est responsable d'infections chez les sujets immunodéprimés, en particulier les patients soignés dans les unités de soins intensifs ou souffrant de maladies hématologiques. Ces infections peuvent être nosocomiales ou communautaires. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont les bactériémies, en particulier chez les sujets cathétersés, et les pneumonies chez les patients ventilés. Ce germe peut également être rencontré dans des infections diverses : endocardites (toxicomanes, pose de prothèse), méningites (neurochirurgie), infections urinaires (sonde urinaire, chirurgie du tractus urinaire), ophtalmiques (porteurs de lentilles de contact, opérations de la cataracte), osseuses (chirurgie orthopédique), articulaires, gastro-intestinales et infections de la peau et des tissus mous [108].

Les conséquences cliniques de la présence de *S. maltophilia* dans les sécrétions bronchiques sont mal évaluées. Il n'a été retrouvé dans la littérature récente aucune observation de dégradation brutale coïncidant avec une primo-colonisation à *S. maltophilia*. Les études de Gladman et col. [111] (1992, portant sur 216 enfants mucoviscidosiques dont

23 ont présenté *S. maltophilia* dans leur expectoration [SM+]), de Demko et col. [112] (1998, portant sur 773 patients dont 211 SM+) et de Goss et col.[113] (2002, 19255 patients dont 1721 SM+) n'ont relevé aucune détérioration clinique à la suite de l'acquisition de *S. maltophilia*, après stratification des résultats en fonction du volume expiré maximal par seconde (VEMS) pour les deux dernières études. Karpati et col. [114] ont isolé *S. maltophilia* chez 25 patients suédois parmi 150 patients suivis entre 1983 et 1992, 12 patients étant infectés de façon chronique. Deux années après que la colonisation chronique a été établie, aucune détérioration clinique n'a été documentée. Par contre, ces patients ont montré une aggravation significative de leur fonction pulmonaire, par rapport à un groupe témoin infecté uniquement par *P. aeruginosa*, après deux à sept années de suivi.

D'autres études ont mis en évidence une détérioration pulmonaire chez des patients colonisés par *S. maltophilia* de façon chronique et sur de longues périodes et présentant de fortes concentrations de ce germe dans leurs expectorations (10^5 - 10^6 UFC/mL) [115,116].

2.2.2. Epidémiologie de *S. maltophilia*

La prévalence de *S. maltophilia* dans la population mucoviscidose varie de façon importante en fonction des centres et des pays et a présenté une forte augmentation depuis le premier isolement de cette bactérie en 1975. Cette augmentation pourrait être en partie liée à l'utilisation de milieux sélectifs pour l'isolement de ce germe ainsi qu'à la pression antibiotique. Au Royaume-Uni et au Danemark [109], certains centres ont rapporté une prévalence avoisinant les 20% et un centre en Espagne a mis en évidence une prévalence d'environ 30% [116]. Aux Etats-Unis, en 2005, la prévalence de *S. maltophilia* était de 12,3% d'après le rapport du Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry [29]. D'après l'observatoire national de la mucoviscidose, en 2000, 155 patients (5% des patients référencés dans l'ONM) ont présenté au moins une fois *S. maltophilia* dans un ECBC.

Les facteurs de risque pour l'acquisition de *S. maltophilia* sont les suivants : état clinique détérioré, âge avancé, sexe féminin, présence de *P. aeruginosa* et *B. cepacia* dans l'année précédant l'acquisition de *S. maltophilia*, hospitalisations, traitements antibiotiques incluant la ciprofloxacine, les aminosides (nébuliseurs) et les antibiotiques anti-*Pseudomonas* utilisés par voie IV, l'utilisation de stéroïdes par voie orale et la présence d'*Aspergillus fumigatus* dans les expectorations [113,117-119].

Le mode d'acquisition de *S. maltophilia* n'est pas encore totalement élucidé bien qu'il semble que la plupart du temps, les souches soient acquises à partir de l'environnement.

Dans les années 1990, à Leeds (Royaume-Uni), Denton et col. [120] ont étudié des souches de cette bactérie isolées de patients mucoviscidosiques et de l'environnement par ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR*) et PFGE. Sur les 163 patients intégrés dans l'étude, *S. maltophilia* a été isolé chez 41 patients (soit 25%). La plupart de ces patients présentaient des souches différentes de *S. maltophilia* et cet organisme était largement répandu à l'hôpital (32% de sites positifs) comme à l'extérieur, dans les habitations de patients colonisés (36%) aussi bien que dans celles de patients non colonisés (42%). Aucune transmission croisée n'a été mise en évidence dans cette étude et les patients colonisés ne semblaient pas contaminer leur environnement. D'après une étude menée par Krzewinski et col. [121], il semble qu'une transmission interhumaine puisse survenir occasionnellement en particulier entre frères et sœurs, et que les patients colonisés de façon chronique soient susceptibles de porter la même souche ou d'acquérir de nouvelles souches au cours du temps.

Enfin, Denton et col. [122] ont montré que le matériel d'aérosolisation peut être une source de contamination par *S. maltophilia* pour les patients atteints de mucoviscidose. Quatre-vingt-neuf nébulisateurs de patients hospitalisés ont été examinés pour la recherche de *S. maltophilia* et 9 (10%) d'entre eux contenaient des souches de cette bactérie. La source de contamination du matériel d'aérosolisation par *S. maltophilia* en milieu hospitalier n'a pas encore été élucidée.

2.2.3. Facteurs de virulence

Les facteurs de pathogénicité sont encore peu connus.

- *S. maltophilia* adhère au plastique ce qui lui permet de coloniser des cathéters et autres matériels à usage médical. Cette espèce est également capable d'adhérer au verre et au téflon [123].
- *S. maltophilia* survit, se multiplie et excrète un pyrogène de faible poids moléculaire dans les solutés injectables et dans les liquides de dialyse [124].
- La paroi possède des sites de fixation pour le fragment Fc des immunoglobulines G, mais leur rôle dans la pathogénie est encore incertain [125].

- Une résistance au pouvoir bactéricide du sérum a été identifiée, notamment chez les souches isolées de malades [126].
- *S. maltophilia* excrète, en grandes quantités, de multiples enzymes (protéase, DNase, RNase, enzymes cytolytiques, élastase, fibrinase, chitinase, lipase, hyaluronidase, mucinase) qui pourraient jouer un rôle dans le pouvoir pathogène.
- En dépit de l'absence de capacité d'invasion, *S. maltophilia* possède des propriétés stimulantes sur le système immunitaire, il peut induire l'expression d'IL-8 (interleukine 8) par les cellules épithéliales et du TNF- α (tumor necrosis factor alpha) par les macrophages, ce dernier contribuant à l'inflammation de l'arbre respiratoire [127].

2.2.4. Diagnostic bactériologique [108]

Les caractères morphologiques et biochimiques des souches de *S. maltophilia* sont remarquablement homogènes.

La croissance de ce germe est facile sur tous les types de milieux. Ce germe est caractérisé par une exigence en méthionine et/ou en acides aminés soufrés comme la cystéine bien qu'environ 4% des souches ne présentent pas cette caractéristique. La température optimale de croissance est de 35°C et aucune culture n'est observée pour des températures inférieures à 5 °C ou supérieures à 40°C. Les colonies sont rondes, à contour régulier, généralement mates avec une zone claire périphérique, et non pigmentées ou pigmentées en jaune pâle. *S. maltophilia* donne sur gélose au sang une décoloration verdâtre du milieu et quelques souches provoquent une hémolyse totale ; sur gélose ordinaire, certaines souches montrent un brunissement. Les colonies ont généralement une odeur ammoniacquée, considérée comme caractéristique. Les souches isolées d'expectorations peuvent avoir un aspect muqueux.

Les souches de *S. maltophilia* rassemblent des bacilles à Gram négatif, aérobies, oxydase négative (ou faiblement et tardivement positive), catalase positive, non sporulés, et mobiles grâce à une ciliature polaire multitrèche à trois flagelles ou plus. La mobilité est constamment observée à 18°C, mais certaines souches sont immobiles à 37°C.

Au sein des bacilles à Gram négatif aérobies, le diagnostic est orienté par l'aspect et l'odeur des cultures, par l'absence d'oxydase et par la production d'une DNase. La recherche de la DNase, qui peut être effectuée sur une gélose au bleu de toluidine et à l'ADN, est un critère important du diagnostic.

L'oxydation du glucose et du maltose, l'hydrolyse de la gélatine, l'hydrolyse de l'esculine, la production d'une lysine décarboxylase, la mise en évidence de la ciliature, l'hydrolyse du Tween 80, ainsi que la croissance sur le milieu au citrate de Simmons supplémenté en méthionine (50 mg/L), sont également des caractères à prendre en considération.

Stenotrophomonas maltophilia peut être confondu avec *Burkholderia cepacia*. Toutefois, *Burkholderia cepacia* est oxydase positive, DNase négative, acidifie le xylose et le mannitol et peut cultiver sur un milieu au citrate de Simmons non enrichi en méthionine.

Plusieurs milieux d'isolement sélectifs ont été proposés : gélose au sang ou gélose MacConkey contenant 10 mg/L d'imipénème ; milieu VIA proposé par Kerr et col. [128], rendu sélectif par l'adjonction de 5 mg/L de vancomycine, 10 mg/L d'imipénème et 2,5 mg/L d'amphotéricine B. Le milieu XMSM (*Xanthomonas maltophilia Selective Medium*) a été mis au point pour l'isolement de souches à partir de l'environnement.

Lorsque seules des techniques phénotypiques sont utilisées, des erreurs d'identification peuvent se produire, ainsi un laboratoire de référence aux Etats-Unis (BcRLR : *Burkholderia cepacia* Research Laboratory and Repository, University of Michigan, Ann Arbor, MI) a mis en évidence des souches de *S. maltophilia* identifiées à tort comme des souches de *B. cepacia* et inversement [129].

Des techniques moléculaires d'identification ont donc été développées pour faciliter l'identification de ce germe, telles que des techniques spécifiques d'espèces (species specific PCR : SS-PCR), amplifiant l'ARNr 23S, qui peuvent également permettre de détecter directement *S. maltophilia* dans les crachats [130].

2.2.5. *S. maltophilia* : une espèce multirésistante aux antibiotiques [131]

L'étude de la sensibilité de *S. maltophilia* aux antibiotiques est délicate car la méthode de diffusion en gélose donne des résultats peu reproductibles, notamment pour les fluoroquinolones et pour l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Le "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) préconise l'utilisation d'une technique par dilution en milieu liquide ou en milieu gélosé. Toutefois, la technique du E-test, beaucoup plus facile à mettre en œuvre, donne des résultats satisfaisants.

Une des raisons de l'émergence de *Stenotrophomonas maltophilia* est la résistance quasi-constante et naturelle à de nombreux antibiotiques dont les bêta-lactamines (ticarcilline, céfotaxime, imipénème) et la faible sensibilité naturelle aux aminosides. Cette espèce est en général sensible aux associations ticarcilline-acide clavulanique, triméthoprime-sulfaméthoxazole, au latamoxef, à la ciprofloxacine et aux tétracyclines. La multirésistance aux antibiotiques en particulier aux bêta-lactamines permet une orientation diagnostique rapide au vu de l'antibiogramme.

Cette espèce synthétise au moins deux bêta-lactamases inductibles, codées par le chromosome : (i) une carbapénamase zinc-dépendante ou bêta-lactamase L1, non inhibée par l'acide clavulanique et (ii) une céphalosporinase ou bêta-lactamase L2, inhibée par l'acide clavulanique.

La membrane externe ne possède qu'un nombre limité de porines et elle s'oppose à la pénétration de plusieurs antibiotiques. De plus, un système d'efflux confère une résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides.

2.3. *Achromobacter xylosoxidans*

L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* a été décrite pour la première fois en 1971 par Yabuuchi et Ohyama qui l'ont isolée de prélèvements de liquide de drainage chez des patients présentant des otites chroniques [132]. Cette espèce est actuellement considérée comme une bactérie émergente dans la mucoviscidose, et sa prévalence a augmenté de façon régulière au cours des vingt dernières années. Elle pose le problème d'une multirésistance naturelle à de nombreux antibiotiques et d'une identification parfois difficile. Son épidémiologie, la signification clinique de sa présence dans le poumon mucoviscidosique et le mode d'acquisition de cette bactérie sont encore mal connus aujourd'hui.

2.3.1. Taxonomie

Le genre *Achromobacter* appartient à la famille des *Alcaligenaceae* placée dans l'ordre des *Burkholderiales* et dans la classe des *Betaproteobacteria*.

La position taxonomique du genre *Achromobacter* a été incertaine au cours des vingt dernières années et l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* a été nommée consécutivement *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*, et *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*. En 1981, cette espèce a été décrite comme l'espèce type du genre *Achromobacter* [133]. En 1984, Kersters et De Ley ont proposé le transfert de cette espèce type dans le genre *Alcaligenes* [134]. Récemment, en 1998, les résultats des études phylogénétiques par analyse des séquences nucléotidiques de l'ARN16S ont démontré que *Achromobacter xylosoxidans* et *Alcaligenes faecalis*, l'espèce type du genre *Alcaligenes* appartiennent à deux genres distincts, respectivement *Achromobacter* et *Alcaligenes* [135].

L'espèce *Achromobacter xylosoxidans* comprend deux sous-espèces : *Achromobacter xylosoxidans* ssp *xylosoxidans* et *Achromobacter xylosoxidans* ssp *denitrificans* qui ont été récemment individualisées en espèces.

2.3.2. Caractéristiques bactériologiques

Cette espèce regroupe des bacilles ou des cocco-bacilles, possédant une ciliature péritriche (1 à 20 flagelles entourés d'une gaine), aérobies (mais quelques souches "respirent" les nitrates), à métabolisme oxydatif, oxydase et catalase positives, non pigmentés, non hémolytiques, non halophiles, donnant une réponse négative aux tests uréase, DNase, phénylalanine désaminase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, arginine dihydrolase et gélatinase [136].

2.3.3. Pouvoir pathogène en dehors de la mucoviscidose et habitat

Les bactéries du genre *Achromobacter* sont des pathogènes opportunistes. Parmi les différentes espèces, *A. xylosoxidans* est la plus fréquemment retrouvée dans des infections diverses de mauvais pronostic (méningites, bactériémies, pneumonies, péritonites, infections du tractus urinaire, pharyngites, endocardites) chez des malades immunodéprimés ou encore chez des prématurés [137,138].

A. xylosoxidans est largement distribué dans l'environnement (eau et sol). Cette espèce a été isolée de divers environnements aqueux (solution désinfectante, liquide de dialyse, solution saline, eau désionisée, eau courante ...) dont certains ont été incriminés dans des épidémies nosocomiales [137,139-141].

2.3.4. *Achromobacter xylosoxidans* et mucoviscidose : prévalence, signification clinique, mode d'acquisition

- Prévalence d'*Achromobacter xylosoxidans* dans la mucoviscidose

Chez les patients mucoviscidosiques, *A. xylosoxidans* constitue un micro-organisme émergent. La fréquence d'isolement de ce germe a progressé au cours des vingt dernières années comme le montre les données américaines (U.S. Cystic Fibrosis Foundation's National Patient Registry) : la prévalence de *A. xylosoxidans* était de 0.5% en 1995, 1.9% en 1996, 2.7% en 1997, 3.8% en 1999, et 5.2% en 2002 [142]. Au cours d'un essai de phase III d'un

aérosol de tobramycine réalisé en 1995 et 1996 aux Etats-Unis, 8,7% des patients étaient colonisés par ce germe [143].

Dans une étude portant sur 557 patients à Leeds au Royaume-Uni, menée entre 1992 et 1999, Tan et col. ont rapporté une prévalence de 2,3% mais n'ont considéré que les patients présentant au moins trois cultures positives au cours d'une période de 6 mois. L'âge médian d'acquisition était de 17,2 ans [144].

Une étude prospective germanique (2005) portant sur 1419 patients a mis en évidence une prévalence de 1,1% [145].

En 2002, en Belgique, 1,9% des patients étudiés présentaient au moins une culture positive. Dans l'étude de De Baets et col., réalisée dans le centre spécialisé de Gand en Belgique et publiée en 2007, 17,9% des 140 patients étudiés présentaient au moins une culture positive, et au moins trois cultures positives sur au moins neuf mois ont été rapportées parmi 5,3% de ces patients. L'âge médian était de 20 ans et la durée de colonisation moyenne de 1,5 années [146].

En Grèce, parmi les 388 patients mucoviscidosiques fréquentant l'hôpital des enfants d'Athènes entre 2000 et 2005, 4,9% ont présenté au moins une culture positive à *A. xylosoxidans*, plus de deux cultures positives furent mises en évidence chez 36,8% d'entre eux et l'âge médian d'acquisition était de 6,7 ans [147].

Enfin, en France, d'après les données de l'ONM, 92 patients (2,9 % des patients référencés dans l'ONM) ont présenté au moins une fois *A. xylosoxidans* dans un ECBC en 2000.

Ces chiffres de prévalence peuvent être discutés, dans la mesure où des erreurs d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants peuvent se produire, en raison de la diversité de la morphologie des colonies et de la variabilité des réactions biochimiques. A ce propos, un taux de 11% d'erreurs d'identification a été mis en évidence par Saiman et col. (2001) qui ont examiné 106 isolats envoyés par divers laboratoires (99 *A. xylosoxidans*, 6 *Alcaligenes*, 1 *Alcaligenes odorans*). Au cours de cette étude, 12 isolats se sont avérés appartenir aux espèces *P. aeruginosa* (10 isolats), *B. cepacia* (1) et *S. maltophilia* (1) [148].

En 2002, une technique de PCR basée sur la séquence de l'ADN ribosomal 16 S présentant une sensibilité de 100% et une spécificité de 97% a été développée par Liu et col. pour faciliter l'identification de cette espèce [149]. En 2006, Wellinghausen et col. [150] ont mis au point une technique d'hybridation in situ utilisant la fluorescence (FISH : Fluorescence

In Situ Hybridization) permettant une identification rapide de cette bactérie et présentant une sensibilité de 100% et une spécificité de 99,2%.

- Signification clinique

La signification clinique de la présence d'*A. xylosoxidans* dans le poumon mucoviscidosique n'est toujours pas élucidée. L'étude de Tan et col. [144] n'a relevé aucune accélération de la détérioration clinique chez les patients colonisés de façon chronique au cours des deux ans suivant l'acquisition de ce germe. De Baets et col. [146] n'ont pas mis en évidence de différence significative dans l'évolution clinique des sujets colonisés mais ont noté une augmentation de la durée du traitement antibiotique chez ces sujets. A l'opposé, Dunne et Maisch [151] ont noté une exacerbation des symptômes pulmonaires chez les patients colonisés. Rønne Hansen et col. [152] ont rapporté un déclin de la fonction respiratoire (évalué par le VEMS) chez des patients présentant une infection chronique et une rapide augmentation des anticorps spécifiques.

- Mode d'acquisition

Le mode d'acquisition d'*A. xylosoxidans* n'est toujours pas élucidé. Il semblerait qu'il puisse être acquis par l'intermédiaire de matériel contaminé, dans la mesure où les nébuliseurs et l'équipement utilisé dans les traitements respiratoires ont été impliqués dans des infections nosocomiales du tractus respiratoire chez des patients non mucoviscidosiques [153].

L'épidémiologie moléculaire d'*A. xylosoxidans* a fait l'objet de peu de publications. Aucun lien entre les isolats issus de patients mucoviscidosiques n'a été retrouvé au cours de différentes études : c'est le cas de l'étude de Dunne et Maish (1995) [151], et de Vu-Thien et col. (1996) [154]. Cependant, dans une étude incluant 92 patients présentant *A. xylosoxidans*, Krewinski et col. (2001) [121] ont trouvé cinq paires de patients présentant des isolats génétiquement identiques, dont deux paires de frères et sœurs, une paire d'amis et deux paires d'individus non liés épidémiologiquement. D'autres cas d'infections croisées, notamment entre frères et sœurs ou entre individus fréquentant le même établissement, ont été rapportés [155,156]. L'étude de Kanellopoulou et al. (2004) [157] a mis en évidence cinq patients portant des isolats identiques parmi neuf patients colonisés par *A. xylosoxidans*. L'étude de Van Daele [158] et col. (2005,) portant sur 13 patients, a révélé la présence de deux groupes

de 4 et 10 patients comportant des isolats génétiquement identiques, un patient présentant deux souches appartenant aux deux groupes. Enfin, dans l'étude de Rønne Hansen et col. au Danemark [152], huit patients parmi 16 patients colonisés de façon chronique portaient la même souche.

Le fait que des patients soient porteurs de souches similaires d'*A. xylooxidans* indique qu'il existe soit une source commune de contamination soit une transmission interhumaine.

2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques

A. xylooxidans est caractérisé par sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques : résistance constante à certaines bêta-lactamines (céfalotine, céfoxitine, céfuroxime, céfotaxime, céfépime, aztréonam), aux aminosides, au triméthoprim, à la fosfomycine et à certaines quinolones. Vis-à-vis des bêta-lactamines, l'individualisation du principal phénotype sensible montre une grande sensibilité à certaines pénicillines telles la ticarcilline, la pipéracilline ou l'azlocilline avec une faible synergie entre amoxicilline et acide clavulanique ou encore céfopérazone et sulbactam. Cette espèce est sensible au céfamandole, à la ceftazidime, ou encore à l'imipénème ainsi qu'aux fluoroquinolones (ciprofloxacine par exemple) ou encore à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole [159].

La résistance acquise, en particulier aux pénicillines dont les uréidopénicillines, par production de différentes bêta-lactamases plasmidiques ou transposables est maintenant bien individualisée. Plus récemment, la résistance acquise, en particulier aux céphalosporines de troisième génération telle la ceftazidime mais aussi aux carbapénèmes tel l'imipénème, a été reliée à d'autres bêta-lactamases transférables initialement identifiées chez *P. aeruginosa*, en particulier des métallobêta-lactamases. Enfin, il peut y avoir une hyperproduction de la bêta-lactamase chromosomique inductible lors de la résistance acquise aux pénicillines et à la ceftazidime [159]. L'étude de Neuwirth et col. (2006) rapporte l'existence d'une souche multirésistante issue d'un patient mucoviscidosique exprimant une bêta-lactamase à spectre étendu VEB-1 [160].

La résistance naturelle ou acquise aux autres antibiotiques est encore peu explorée.

D'après l'étude de Saiman et col. (2001) [148], la minocycline, l'imipénème, le méropénème, la pipéracilline, et l'association pipéracilline-tazobactam figurent parmi les antibiotiques les plus actifs sur les souches d'*A. xylooxidans* issues de patients

mucoviscidosiques et l'association chloramphenicol/ minocycline et ciprofloxacine/ imipénème ou méropénème constituent les associations les plus actives.

En conclusion, bien que le rôle joué par *A. xylosoxidans* dans l'évolution de la maladie est encore incertain, l'exactitude de l'identification de cette bactérie est nécessaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, c'est un pré-requis indispensable pour mieux comprendre l'épidémiologie et l'impact clinique de cette bactérie. Deuxièmement, cette espèce est souvent confondue avec d'autres bacilles non fermentants, notamment *Pseudomonas spp.* et les espèces du complexe *cepacia*, ce qui n'est pas dénué de conséquences sur la gestion des patients notamment en ce qui concerne les mesures de ségrégation. Troisièmement, il s'agit d'une espèce naturellement résistante à plusieurs antibiotiques et enfin, une transmission croisée des souches semble se produire plus fréquemment que ce que l'on avait imaginé précédemment.

2.4. Le complexe *Burkholderia cepacia*

Bacille à Gram négatif non fermentant, aérobic strict, mobile grâce à plusieurs flagelles polaires, présentant une oxydase lente, *Burkholderia cepacia*, a été décrit pour la première fois en 1950 par Walter Burkholder comme une bactérie phytopathogène isolée à partir d'un bulbe d'oignon dont il causait la pourriture (*cepa* = oignon).

Reconnu pendant longtemps comme un phytopathogène et un saprophyte possédant un faible pouvoir pathogène chez l'humain, cette bactérie a par la suite été reconnue comme un pathogène opportuniste responsable d'infections sporadiques chez les sujets immunodéprimés et également d'infections nosocomiales [161].

B. cepacia a émergé ces dernières années en tant que germe responsable de surinfections pulmonaires dans la mucoviscidose. Les premières publications faisant mention d'infection à *B. cepacia* chez les patients mucoviscidosiques sont apparues en Amérique du nord à la fin des années 1970 et au début des années 1980. Dans une publication de 1984, Isles et col. mettent en évidence une élévation de la prévalence de la colonisation/infection à *B. cepacia* dans le centre de traitement de patients CF de Toronto, et décrivent en détail la signification clinique de l'infection, et en particulier le syndrome *cepacia* [162].

Peu de temps après, des cas de ce syndrome et une augmentation de l'incidence des infections à *B. cepacia* parmi les patients CF furent observés dans d'autres centres de traitement CF en Amérique du Nord [163].

L'attention de la communauté médicale concernant les espèces du complexe *cepacia* a surtout été attirée par trois séries de faits, tout d'abord, une rapide et fatale détérioration de l'évolution clinique (« syndrome *cepacia* ») chez certains patients contaminés, ensuite une résistance naturelle très préoccupante de cette bactérie aux antibiotiques, notamment aux aminoglycosides et à la colistine, régulièrement utilisés en aérosols chez les patients atteints de mucoviscidose colonisés par *P. aeruginosa*, et enfin, une diffusion très rapide de cette bactérie, de personne à personne, au sein d'un même centre de soins.

2.4.1. Taxonomie du complexe *Burkholderia cepacia* [164]

La position taxonomique de *Burkholderia cepacia* est en constante évolution. Initialement, cette bactérie était classée dans le genre *Pseudomonas*, et portait le nom de *P. cepacia*. D'autres noms furent employés : *P. multivorans*, *P. kingii* mais des études ont montré qu'il s'agissait en fait de synonymes de *P. cepacia*. En 1981, au vu des résultats de l'hybridation ARNr - ADN, Palleroni et Holmes divisent le genre *Pseudomonas* en cinq groupes d'homologie ; *P. cepacia* faisant alors partie du groupe II d'homologie. En 1992, Yabuuchi et col., en se basant sur la séquence des ARNr 16S, sur les homologies ADN - ADN, sur la composition des lipides et des acides gras et sur les caractères phénotypiques, transfèrent les sept espèces du groupe d'homologie II (*Pseudomonas caryophylli*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas pseudomallei* et *Pseudomonas solanacearum*) dans un nouveau genre, le genre *Burkholderia*. Le genre *Burkholderia* est placé dans la classe des *Betaproteobacteria*. Il est donc phylogénétiquement éloigné du genre *Pseudomonas* placé dans la classe des *Gammaproteobacteria*. Par la suite, le genre *Burkholderia* a connu de nombreux remaniements :

- de nouvelles espèces ont été décrites
- *Burkholderia pickettii* et *Burkholderia solanacearum* ont été transférées dans le nouveau genre *Ralstonia*.
- *Burkholderia norimbergensis* a été transférée dans le nouveau genre *Pandoraea*.
- Des synonymies ont été mises en évidence entre *Burkholderia cocovenenans* et *Burkholderia gladioli* ainsi qu'entre *Burkholderia vandii* et *Burkholderia plantarii*.

En 1997, Vandamme et col. ont montré que l'espèce *Burkholderia cepacia* était en fait un ensemble de génomovars désigné sous le nom de « complexe *Burkholderia cepacia* » ou « *Burkholderia cepacia sensu lato* », ce complexe comprend alors cinq génomovars dont seulement trois individualisés en espèces (II = *Burkholderia multivorans* ; IV = *Burkholderia stabilis* ; V = *Burkholderia vietnamiensis*) [165].

Le terme génomovar est utilisé pour différencier des souches phénotypiquement similaires mais génotypiquement hétérogènes. Ainsi, les génomovars présentent des génotypes spécifiques mais ne peuvent être distingués par les tests biochimiques usuels employés en

routine dans les laboratoires. Cependant, certaines caractéristiques phénotypiques susceptibles de différencier les génomovars ont été mises en évidence récemment, permettant de les nommer avec la nomenclature binomiale [166].

Les ADN des espèces du "complexe *cepacia*" présentent entre 30 à 60 % d'homologie alors que les pourcentages d'homologie ADN - ADN, obtenus avec les autres espèces du genre, sont généralement inférieurs à 30. Les études phylogénétiques révèlent également une parenté entre ces génomovars car les séquences de leurs ARNr 16S présentent plus de 97,7 % de similitude. En revanche, les homologies de séquence ne dépassent pas 97 % avec les autres représentants du genre *Burkholderia* [164].

Actuellement, le complexe *cepacia* comporte neuf génomovars (tableau 2).

Génomovar	Nom
Génomovar I	<i>Burkholderia cepacia sensu stricto</i>
Génomovar II	<i>Burkholderia multivorans</i>
Génomovar III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
Génomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>
Génomovar V	<i>Burkholderia vitenamiensis</i>
Génomovar VI	<i>Burkholderia dolosa</i>
Génomovar VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>
Génomovar VIII	<i>Burkholderia anthina</i>
Génomovar IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>

Tableau 2 : Les différentes espèces du complexe *cepacia*. D'après Courtney et col. 2004 [166].

Pour compliquer le tout, *B. cenocepacia* présente une forte hétérogénéité génétique, et le polymorphisme du gène RecA a permis de différencier quatre lignées au sein de cette espèce : IIIA, IIIB, IIIC, and IIID. Les lignées IIIA et IIID ont été uniquement retrouvées dans des spécimens cliniques, la lignée IIIC uniquement au niveau du sol et la lignée IIIB au niveau du sol et des spécimens cliniques [167].

2.4.2 Habitat et pouvoir pathogène (voir figure 13)

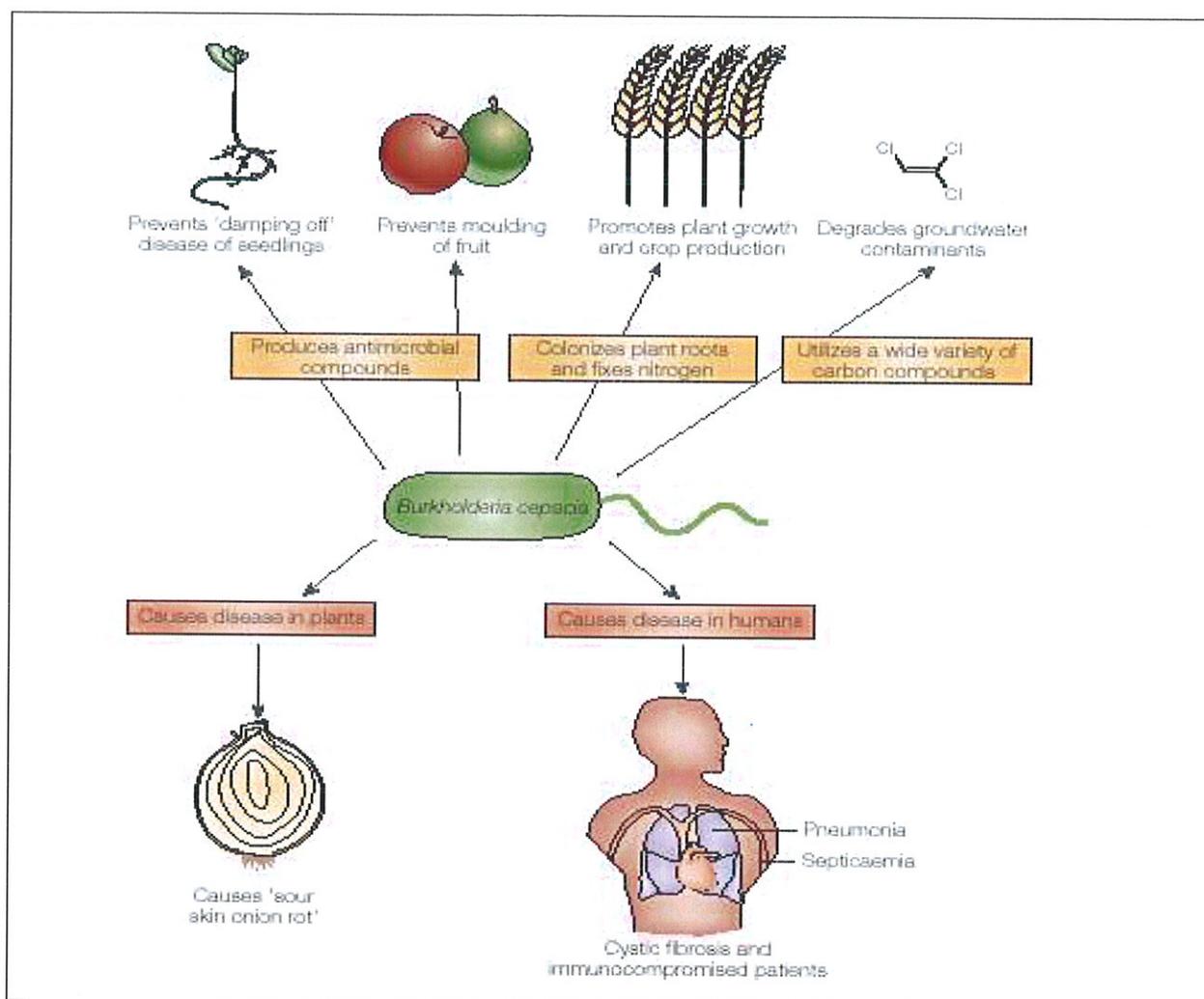


Figure 13 : Effets bénéfiques et néfastes des espèces du complexe *cepacia*. D'après Mahenthiralingam et col. 2005 [171].

Bien que les espèces du complexe *cepacia* aient été reconnues à l'origine comme des phytopathogènes de l'oignon et sont maintenant connues comme des pathogènes opportunistes chez l'homme, elles possèdent également un effet bénéfique sur l'environnement par leurs capacités antifongiques et dépolluantes et constituent de ce fait de véritables « Jekyll and Hyde microbiens ».

Les souches incluses dans le complexe *cepacia* sont des bactéries ubiquistes dans l'environnement. Elles sont retrouvées dans le sol, sur les végétaux et dans l'eau.

Ce sont des bactéries phytopathogènes responsables de la carie de l'oignon en induisant sur le bulbe en conservation la pourriture des écailles.

Elles peuvent survivre au sein des amibes libres du genre *Acanthamoeba*. Ces amibes pourraient constituer un réservoir du complexe *cepacia* et jouer un rôle dans la transmission de cette bactérie chez les patients CF [168].

D'autre part, les espèces du complexe *cepacia* sont considérées comme bénéfiques pour l'environnement naturel, non seulement par leur aptitude à augmenter le rendement des cultures agricoles et forestières par production d'antifongiques contre les agents phytopathogènes (*Alternaria*, *Aphanomyces*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*...), ce qui limiterait alors le besoin en antifongiques chimiques ; mais également par leur extraordinaire capacité métabolique, qui leur permet de dégrader un large panel de composés organiques, de survivre dans un environnement nutritionnel limité et de dégrader des composés aromatiques (déchets industriels, pesticides) ce qui permettrait de les utiliser en tant qu'agents biodégradants des polluants organiques [169-171].

L'utilisation des bactéries de ce complexe en tant qu'agent de lutte biologique contre les micro-organismes phytopathogènes ou en tant qu'agent dépolluant pose des problèmes de santé publique dans la mesure où (1) les neuf espèces de ce complexe sont susceptibles d'être des pathogènes opportunistes chez les patients mucoviscidosiques ou immunodéficients, (2) les relations entre souches de l'environnement et souches cliniques ne sont pas totalement élucidées, (3) et le risque d'acquisition de facteurs de virulence à partir de *B. pseudomallei*, présent dans les sols des pays tropicaux ne peut être écarté pour l'instant. C'est pourquoi un moratoire a été décidé par la communauté scientifique internationale avant l'utilisation de souches de *B. cepacia* en agriculture à grande échelle, jusqu'à ce qu'une évaluation fiable du risque soit rendue possible [170].

Chez l'homme, les espèces du complexe *cepacia*, tout comme les autres agents opportunistes, n'infectent pas en général les individus en bonne santé mais ceux qui sont immunocompromis. Contrairement aux autres agents opportunistes, les espèces du complexe *cepacia* ne sont pas des espèces commensales de l'organisme et l'infection peut être nosocomiale ou acquise à partir de l'environnement [171].

Le complexe *Burkholderia cepacia* est impliqué dans trois groupes d'infections : 1) infections nosocomiales (bactériémies, infections respiratoires, abcès, arthrites aiguës, et infections urinaires), survenant après utilisation de liquides contaminés (eau distillée, solutés injectables, solutions antiseptiques (ammoniums quaternaires, chlorexidine, polyvidone iodée)), ou à la suite de manœuvres invasives (cathétérisme intraveineux, intubation/ventilation, sondage urinaire) ; 2) infections sévères chez les immunodéprimés (bactériémies chez le drépanocytaire, sepsis et infections pulmonaires chez les patients

atteints de granulomatose septique chronique) ; 3) colonisations/infections respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose [170].

Au cours de la mucoviscidose, la gravité de la colonisation/infection par le complexe *Burkholderia cepacia* est très variable, allant de la simple colonisation asymptomatique à la pneumonie nécrosante parfois associée à une septicémie, connue sous le nom de "syndrome *cepacia*", bien souvent fatale et observée chez environ 20 % des sujets infectés. *B. cenocepacia* est très souvent associé à ce syndrome. Ces variabilités au niveau du tableau clinique ont été observées chez des patients présentant le même clone. Les raisons de ces variabilités cliniques n'ont pas été élucidées mais il paraît évident que des facteurs de l'hôte et des souches agissent de façon concomitante sur la pathogénèse [171].

De façon générale, l'infection d'un patient CF par une espèce du complexe *cepacia* est à l'origine d'un déclin pulmonaire plus important et est par conséquent corrélée à une morbidité et une mortalité plus importante [166,172-174].

Des complications infectieuses souvent létales peuvent se produire en post-transplantation pulmonaire, et la colonisation représente pour certaines unités de transplantation une contre-indication à la greffe, surtout si la multirésistance aux antibiotiques débouche sur une impasse thérapeutique [170].

2.4.3. Mode d'acquisition des espèces du complexe *Burkholderia cepacia*

Le fait que l'émergence des bactéries du complexe *cepacia* en tant que pathogène dans la mucoviscidose ait coïncidé avec la mise en place du regroupement médical des patients au sein d'unités spécialisées, et de groupes sociaux (camps d'été...), fit envisager l'hypothèse d'une transmission interhumaine de ces bactéries. Par la suite, l'étude moléculaire des souches, notamment par ribotypage, a permis de démontrer que l'augmentation de prévalence observée dans certains centres de soins était due à la transmission interhumaine des souches, possible non seulement dans le cadre des soins, mais également lors de contacts sociaux [175-177].

Bien que cela soit rare, il a été montré qu'une propagation épidémique des bactéries de ce complexe pouvait également survenir entre des patients non mucoviscidosiques et entre des patients CF et non CF [171].

Les contacts sociaux avec des sujets infectés, la participation à des camps d'été, le fait d'avoir un frère ou une sœur infecté, et les hospitalisations constituent des facteurs de risque de transmission de ces bactéries entre patients CF.

La transmission directe par proximité physique est certainement le mode majeur de contamination, les sécrétions respiratoires des patients étant très riches en bactéries. Elle peut se produire par le biais des gouttelettes de Pflügge en aérosol ou par contact physique direct avec un individu ou une surface contaminée. La survie de *B. cepacia* dans l'air a été démontrée, et les pièces de physiothérapie peuvent constituer un lieu de contamination [170].

La mise en évidence de la transmission interhumaine des souches a conduit à des mesures strictes de ségrégation entre patients infectés et non infectés dans les communautés de patients atteints de mucoviscidose (port de masques, consultation à différentes périodes, suppression des camps d'été...), pour prévenir la diffusion des souches, ce qui n'a pas été sans retentissement sur le bien-être social et psychologique de la communauté mucoviscidose.

Cependant, la transmissibilité varie de façon marquée en fonction des souches, et la plupart des souches ne sont pas impliquées dans des épidémies, mais semblent être acquises de façon indépendante. Par exemple, aucun cas de transmission n'a été rapporté au centre CF de l'université de Caroline du Nord, en dépit de contacts sociaux et hospitaliers entre les patients et en l'absence de mesures rigoureuses de contrôle de l'infection. Des acquisitions indépendantes de *B. cepacia sensu lato* sans preuve de transmission entre les patients CF ont été également rapportées au Danemark [169].

Dans les cas où la transmission interhumaine n'apparaît pas être le mode d'acquisition, la source de contamination, et en particulier le rôle des souches de l'environnement naturel, reste à élucider. Récemment, LiPuma et col. [178] ont trouvé dans l'environnement un isolat génétiquement identique à la souche de *B. cenocepacia* responsable de l'épidémie de Philadelphie qui s'est produite dans les années 1980. Ce résultat indique que les souches pathogènes humaines ne sont pas nécessairement distinctes des souches environnementales et qu'une source de contamination environnementale est possible, ce qui pourrait expliquer le fait qu'en dépit des mesures de contrôle de l'infection (ségrégation) qui ont été à l'origine d'une diminution du nombre de cas d'infection, de nouveaux cas d'infection surviennent encore.

La question de savoir si l'utilisation de *B. cepacia* en agronomie pour ses propriétés dépolluantes ou antifongiques représente un danger potentiel pour la santé humaine, est par conséquent tout à fait d'actualité.

2.4.4. Epidémiologie

a) Epidémiologie générale

La prévalence de l'infection par les espèces du complexe *cepacia* chez les patients mucoviscidosiques est variable selon les pays et les Centres de soins, en fonction de l'importance de la diffusion interhumaine des souches. En France, l'Observatoire National *B. cepacia*/AFLM (Association française de lutte contre la mucoviscidose) est chargé de la surveillance épidémiologique des colonisations/infections à *B. cepacia*. Ainsi, en 2001, les données épidémiologiques pour notre pays sont les suivantes : la prévalence est voisine de 3,1%, avec une incidence voisine de 0,5 %, mais dans certains Centres de soins spécialisés, la prévalence peut atteindre 40 %. Classiquement, l'apparition de *B. cepacia* est relativement tardive (vers l'âge de 13-14 ans) mais cependant, 35 % des cas surviennent avant 11 ans ; la colonisation est le plus souvent chronique (70 % des cas) ; les cas de septicémie sont relativement rares, survenant chez environ 2 % des patients colonisés [170]. En 2005, aux Etats-Unis, 3,1% des patients mucoviscidosiques étaient infectés avec un membre du complexe *cepacia* [29].

Bien que toutes les espèces du complexe *cepacia* soient susceptibles de coloniser/infecter les patients mucoviscidosiques, il existe une distribution disproportionnée de celles-ci avec une prédominance de *B. cenocepacia* et *B. multivorans* qui représentent à elles deux, plus de 90 % des infections associées au « complexe *B. cepacia* » au cours de la mucoviscidose (tableau 3). Les raisons de cette prédominance ne sont pour l'instant pas élucidées. Cependant, il a été montré que *B. cenocepacia* et plus particulièrement *B. multivorans* n'apparaissent pas plus abondantes que les autres espèces dans l'environnement naturel [179] bien que les niches préférentielles pour chaque espèce restent à définir. *B. ambifaria*, espèce très présente dans l'environnement, est rarement retrouvée chez les patients mucoviscidosiques [171,179]. La forte représentation de *B. cenocepacia* et *B. multivorans* chez les patients suggère une capacité d'infection supérieure à celle des autres espèces.

	Etats-Unis 1997-2004 *	Australie 2002 **	Irlande Grande-Bretagne Europe continentale 1997- 2001 ***	Belgique 1999-2000 ****	France 1999 -2000 *****	Italie 2001-2003 *****
Nombre de patients	1218	50	131	12	153	31
<i>B. cepacia</i> sensus stricto	3,1	18	0,76	0		3,2
<i>B. multivorans</i>	38,7	30	17,6	75	51,6	0
<i>B. cenocepacia</i>	45,6 A=27,2 B=72,8	42 A=28,5 B=71,5	78,6 A=91 B=9	16,7	45,1	90,3 A=64,3 B=35,7
<i>B. stabilis</i>	0,3	0	0,76	8,3	1,3	3,2
<i>B. vietnamiensis</i>	5,9	4	2,29		0,6	3,2
<i>B. dolosa</i>	3,8	2	0		0	0
<i>B. ambifaria</i>	0,8	4	0		0	0
<i>B. anthina</i>	0,2	0	0		0	0
<i>B. pyrrocinia</i>	0,3	0	0		1,3	0
Prévalence				1,8 (12/650)		11,23 (31/276)
Age moyen				20,5		21,5
Mortalité				33		29

Tableau 3 : Distribution des différentes espèces du complexe *cepacia* dans divers pays d'Europe et du monde.
D'après *Reik et col., 2005 [180] ; **Kidd et col., 2003 [181] ; ***McDowell et col., 2004 [182] ; **** De Boeck et col. 2004 [183]; ***** Brisse et col., 2004 [184] ; *****Lambliaze et col. , 2007 [185].

En 2006, d'après les données de l'Observatoire Cepacia, 116 patients ont été déclarés colonisés par un membre du complexe *cepacia*. Parmi ces cas, 110 cas dont 18 nouveaux ont été confirmés par l'Observatoire. L'âge moyen de la population colonisée est de 20 ans et l'âge moyen de primo-colonisation de 15 ans. L'espèce *B. cenocepacia* prédomine (52 cas) suivie de l'espèce *B. multivorans* (45 cas). Parmi les 18 nouveaux cas, *B. multivorans* représente 8 cas, et *B. cenocepacia* 6 cas. 48 patients ont présenté un état stable, alors que 31 patients ont montré une détérioration clinique et 7 patients sont décédés. Trois syndromes cepacia ont été signalés chez des patients colonisés par *B. cenocepacia* dont 2 sont décédés. Une seule septicémie (à *B. cenocepacia*) a été signalée, en suite de transplantation.

- b) Distribution des clones de *B. cepacia* dans les communautés de patients atteints de mucoviscidose et mise en évidence de marqueurs potentiels de transmissibilité

De nombreuses études ont été réalisées dans le but de déterminer si une espèce ou une souche du complexe *cepacia* était davantage représentée dans les transmissions interhumaines. Des épidémies avec des souches de *B. cepacia*, *B. dolosa* et *B. multivorans* ont été documentées mais la plupart des cas de transmissions interhumaines sont liées à *B. cenocepacia* [171].

D'autre part, les études moléculaires à grande échelle ont permis de montrer l'existence de clones de niveaux différents de transmissibilité : clones hautement transmissibles, à diffusion large (plusieurs régions, voire plusieurs pays concernés); clones hautement transmissibles, à diffusion limitée au sein d'un Centre de soins ; clones faiblement transmissibles (deux ou trois patients colonisés) ; clones uniques enfin, présents chez un seul patient [170].

Trois souches épidémiques de *B. cenocepacia* – ET12 (Canada et Royaume-Uni), Midwest, et PHDC (USA)- ont été responsables d'une importante morbidité et mortalité pendant les vingt dernières années [171]. La souche ET-12 est responsable de l'épidémie la plus importante parmi les patients mucoviscidosiques, qui a débuté au Canada et s'est propagée au Royaume-Uni à la fin des années 1980 et tout au long des années 1990. Ce clone, mis en évidence par une technique d'analyse de variants électrophorétiques de différentes enzymes (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) est caractérisé par un allèle particulier d'estérase (ET12 = électrophorétype 12).

Récemment, Coenye et col. ont décrit des souches européennes comportant la même empreinte génétique que la souche PHDC, ce qui peut faire penser que cette souche constitue le deuxième clone épidémique majeur [171].

En France, cinq clones se montrent hautement transmissibles, et représentent environ 65% des colonisations, alors que les clones uniques et les clones faiblement transmissibles représentent respectivement 25 et 10% des colonisations. Les clones hautement transmissibles décrits appartiennent soit à l'espèce *B. cenocepacia* (3 clones), soit à l'espèce *B. multivorans* (2 clones). La colonisation d'un même patient par plusieurs clones simultanément ou successivement a été rapportée [170].

La constatation de niveaux de transmissibilité différents selon les clones a conduit à rechercher des marqueurs qui permettraient d'évaluer le risque de diffusion interhumaine associé à chaque souche, et de mieux cibler les mesures de prévention. À ce jour, quatre marqueurs de transmissibilité ont été décrits, les deux premiers paraissant spécifiques du clone anglo-canadien ET12 [170] :

1. le gène *cbIA* : ce gène, codant pour la sous-unité structurale majeure des pili de type «cable» (voir ci-après) est systématiquement retrouvé chez les isolats appartenant au clone hautement transmissible ET12 [186], mais s'avère absent dans les autres clones épidémiques ;

2. la séquence d'insertion hybride IS1356-IS402, est également spécifique du clone ET12, bien qu'absente d'un petit nombre d'isolats appartenant à ce clone [187] ;

3. le marqueur BCESM (*B. cepacia epidemic strain marker*), retrouvé principalement chez *B. cenocepacia*, correspond à un fragment conservé d'ADN de 1,4 kb et comporte dans sa séquence un cadre de lecture ouvert ORF (open reading frame) nommé *esmR* (*epidemic strain marker regulator*) ayant des homologies avec les régulateurs négatifs de transcription. Ce marqueur a, dans un premier temps, été identifié comme étant spécifique des souches épidémiques [188]. Parmi les patients canadiens, le BCESM est retrouvé dans plus de 80% des souches de *B. cenocepacia* et seulement 23% des souches aux Etats-Unis. Il a été montré que la présence des souches BCESM+ est problématique dans la mesure où elles sont susceptibles de remplacer les souches de *B. multivorans*, qu'elles sont transmissibles d'un patient à l'autre et à l'origine d'une augmentation de la mortalité chez les patients CF. Cependant, la relation de ce marqueur avec le caractère transmissible n'est pas absolue, puisqu'il a été retrouvé non seulement dans quelques souches d'origine environnementale, mais aussi chez 11 des 76 isolats sporadiques britanniques testés dans l'étude de Clode et col. [189].

4. la séquence d'insertion IS1363, retrouvée au niveau du clone ET12, et plus particulièrement au niveau du clone PHDC, dans lequel elle existe en plusieurs copies [190].

Suite à la mise en évidence de ces marqueurs, il a été suggéré de n'appliquer les mesures de ségrégation qu'aux patients porteurs de souches positives pour ces marqueurs. Cependant, dans la mesure où des études ont montré la présence de ces marqueurs dans des souches

sporadiques et leur absence dans certaines souches épidémiques [182,191,192], il est toujours préconisé de séparer les patients mucoviscidosiques en fonction de la colonisation/ non colonisation par une espèce du complexe *cepacia* et non sur la présence potentielle de marqueurs de transmissibilité.

2.4.5. Structure génomique et principaux facteurs de virulence [170,171]

Le génome de *B. cepacia sensu lato* est caractérisé par la présence de deux à quatre chromosomes circulaires contenant plusieurs opérons *rrn*, éventuellement associés à un ou plusieurs plasmides cryptiques, alors que la plupart des bactéries possèdent un chromosome circulaire unique. En conséquence, la taille du génome est très variable, pouvant atteindre plus de 8 Mb, soit deux fois la taille du génome d'*Escherichia coli* [170]. D'autre part, le génome comporte un grand nombre de séquences d'insertion qui sont capables de promouvoir des réarrangements et d'activer l'expression de gènes de voisinage. Cela explique probablement l'exceptionnelle adaptabilité de *B. cepacia* à des environnements très divers et la capacité d'acquisition de nouvelles propriétés (utilisation de nouveaux substrats comme sources uniques de carbone, fonctions cataboliques...).

Le génome de la souche ET12 de *B. cenocepacia* a été précédemment séquencé (voir figure 14), il a une taille de 8,056 Mb, avec un contenu en G+C de 66,9%. Il comporte trois réplicons chromosomiques, un plasmide de 92 kb, plusieurs types de séquences d'insertions et plusieurs îlots génomiques, ces derniers représentant 10% du génome. La taille et le contenu de ces îlots varient de façon remarquable ce qui prouve qu'ils dérivent d'éléments mobiles tels que les transposons, les plasmides ou les bactériophages.

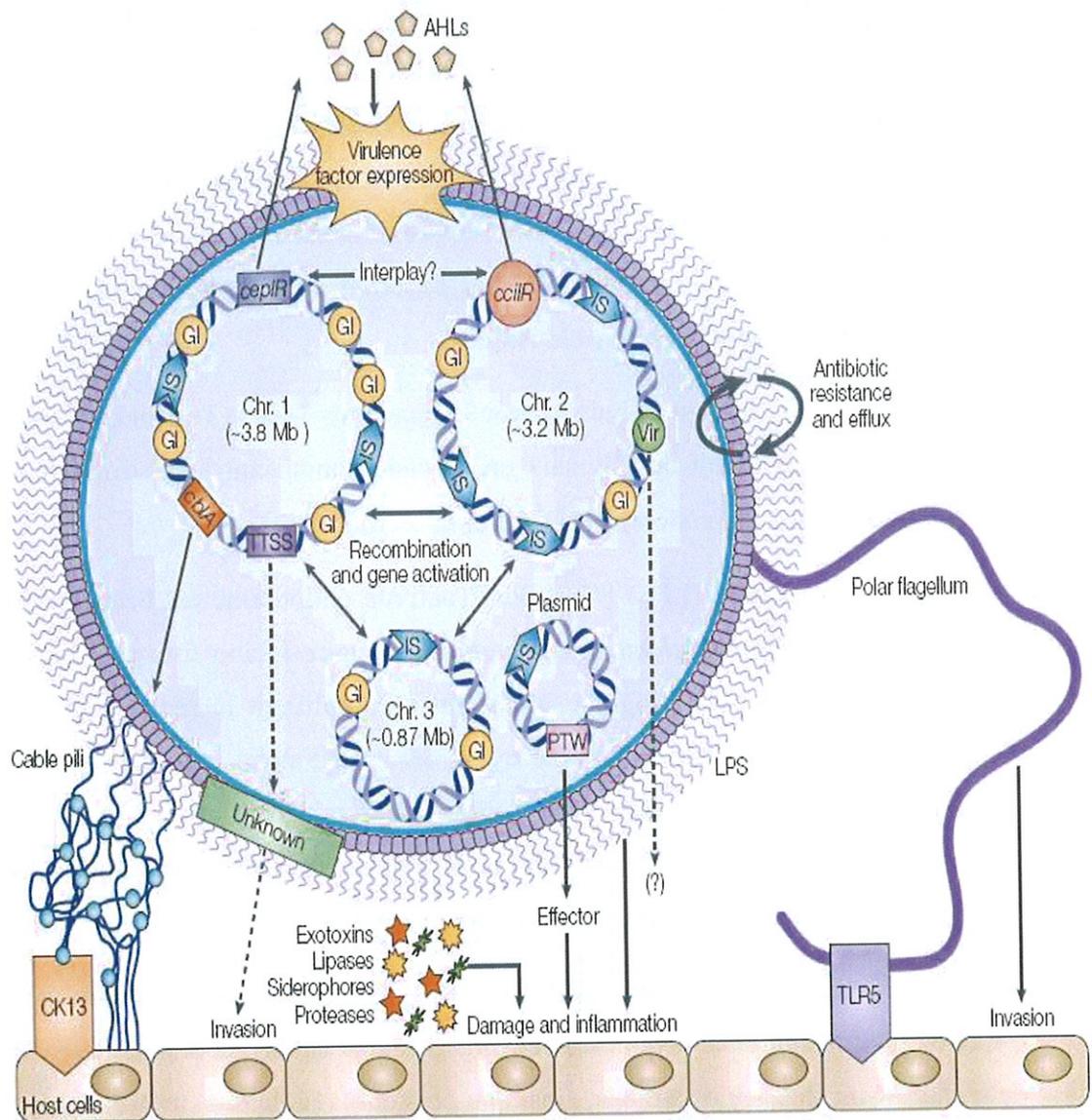


Figure 14: Structure génomique et principaux facteurs de virulence de *Burkholderia cenocepacia* ET12. D'après Mahenthiralingam et col. 2005 [171].

(Chr.1, 2 et 3 : chromosomes circulaires, GI : genomic island, IS : insertion sequence, rond bleu : adhésine de 22kDa, cepIR et cciIR : système de quorum sensing, AHLs ; acylhomosérine lactones).

Les espèces du complexe *B. cepacia* produisent une variété importante de facteurs de virulence dont certains sont susceptibles d'expliquer le tropisme respiratoire de *B. cepacia*, en particulier pour le poumon mucoviscidose, et la variabilité de l'impact clinique de la colonisation. Parmi ces facteurs de virulence, on peut citer :

- le Cable pili et l'adhésine de 22 kDa qui jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules et aux mucines [170,171]. Cinq classes de pili ont été différenciées dans les espèces du complexe *cepacia* par microscopie électronique, dont seuls les pili de type II ou cable-pili, codés par le gène *cblA*, ont été associés à la souche épidémique anglo-canadienne ET-12. Les cable-pili

sont des appendices larges de 2 à 4 nm, exprimés de façon péritriche, ils s'entremêlent pour former des structures semblables à des câbles qui adhèrent aux mucines. Les câbles pili associés à l'adhésine de 22 kDa, exprimés par certaines souches de *B. cenocepacia*, peuvent se lier à un récepteur : la cytokératine 13 (CK13) qui est une protéine structurale du cytosquelette des cellules de l'hôte, dont l'expression est augmentée au niveau de l'épithélium CF. Ainsi, ces souches pourraient avoir un potentiel infectieux plus important que les autres souches chez les patients mucoviscidosiques.

- Le flagelle [171] : lors de sa liaison avec le récepteur TLR5 (Toll-like receptor), la flagelline de *B. cenocepacia* induit des signaux en cascade conduisant à la stimulation de la réponse inflammatoire par l'activation de NF- κ B et la sécrétion d'IL-8.

- Le lipopolysaccharide (LPS) [172] dont l'activité endotoxine est beaucoup plus importante que celle du LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (quatre à cinq fois plus importante), semble jouer un rôle immunopathologique important en amplifiant la réponse inflammatoire. Il est capable de stimuler la production de cytokines : TNFalpha, interleukine-8, de favoriser le recrutement des polynucléaires et d'initier le burst oxydatif [170,171]. Le rôle pro-inflammatoire de *B. cepacia* via son LPS pourrait contribuer à la dégradation de l'état pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose.

- Le *cenocepacia* island (*cci*) [171] : cet îlot génomique comporte des gènes codant des produits intervenant dans le quorum-sensing (système *cciIR*), la biosynthèse des acides gras et le métabolisme des acides aminés, ainsi que plusieurs régulateurs transcriptionnels.

- les sidérophores [170] : quatre types de sidérophores, intervenant dans la captation du fer, peuvent être produits par *B. cepacia* : pyochéline, cépabactine, acide salicylique (initialement dénommé azurécheline), ornibactine. Si la cépabactine est beaucoup plus fréquente chez les isolats environnementaux que chez les isolats cliniques, les autres sidérophores sont produits par 60 à 92 % des isolats cliniques issus de mucoviscidose ; les profils de production sont identiques pour différentes souches d'un même clone bactérien. La relation entre virulence et sidérophores a été suggérée par l'association de la production de pyochéline à une plus grande morbidité et mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose, ainsi que par la moindre virulence sur modèle animal de mutants ne produisant pas d'ornibactine.

- les facteurs extracellulaires [170] : à la différence de *P. aeruginosa*, *B. cepacia* ne produit pas d'exotoxine A, ni d'exo-enzyme S, ni d'élastase. Différents exoproduits ont été mis en évidence : protéase, phospholipase C hémolytique et non hémolytique, dont le rôle dans la virulence n'est pas clairement démontré. Récemment, la production d'une hémolysine capable d'induire l'activation, la dégranulation et l'apoptose des polynucléaires, ainsi que l'inhibition de *Staphylococcus aureus* a été décrite chez la souche anglo-canadienne ET12. De rares souches de *B. cepacia* produisent un exopolysaccharide conférant à leurs colonies un caractère mucoïde.

Il a été montré que les isolats du complexe *cepacia* peuvent former des biofilms *in vitro*, ils présentent alors une résistance augmentée à la ceftazidime et la ciprofloxacine. Les espèces de ce complexe peuvent détecter les signaux de quorum sensing sécrétés par *P. aeruginosa* et former des biofilms mixtes avec *P. aeruginosa* qui est souvent retrouvé au même moment dans le poumon mucoviscidosique. La formation de biofilm par les espèces du complexe *cepacia* pourrait constituer comme pour *P. aeruginosa* un système de défense envers les antibiotiques et les défenses immunitaires de l'hôte [171].

Enfin, la chronicité des infections, ainsi que l'inefficacité clinique d'antibiotiques actifs *in vitro*, amènent à penser que *B. cepacia* pourrait se comporter comme un pathogène intracellulaire facultatif. La capacité d'invasion des cellules épithéliales respiratoires et des macrophages pulmonaires a été démontrée. Les propriétés de la souche épidémique anglo-canadienne ET12 et d'une souche environnementale ont été comparées : si les capacités invasives sont similaires, seule la souche clinique est capable de survivre et de se répliquer dans les macrophages [193].

2.4.6. Diagnostic bactériologique

L'identification d'une espèce du complexe *cepacia* chez un patient mucoviscidosique a des conséquences à la fois personnelles, médicales et thérapeutiques. En effet, sur le plan social, le patient colonisé doit subir les mesures de ségrégation nécessaires à la prévention de la diffusion des souches, sur le plan clinique, il existe un risque d'accélération de la maladie et de non éligibilité à une éventuelle greffe et sur le plan thérapeutique, un traitement adéquat devra être mis en place. Par conséquent, une détection sensible et précoce de la colonisation

par *B. cepacia* s'avère indispensable chez les patients atteints de mucoviscidose. Or ces patients sont très souvent colonisés par d'autres bactéries, en particulier *P. aeruginosa*, dont la croissance est beaucoup plus rapide que celle de *B. cepacia* et peut ainsi en occulter la présence. De plus, en raison de la complexité taxonomique de cette bactérie et de l'émergence de nouvelles espèces proches sur le plan phénotypique, l'identification des espèces ce complexe constitue un véritable défi.

- Isolement de la bactérie [170]

D'après le Rémic [73], les recommandations concernant la recherche de *B. cepacia* sont les suivantes : seuil inférieur de dénombrement à 10^2 UFC/ml, utilisation d'un milieu sélectif, observation prolongée (72 heures). Trois types de milieux sélectifs, qui contiennent tous de la polymyxine B, sont utilisables:

- le milieu PC (*Pseudomonas cepacia*) rendu sélectif par l'addition de cristal violet, de sels biliaires, de ticarcilline et de polymyxine B et changeant de couleur en fonction du métabolisme du pyruvate;
- le milieu OFBPL (*oxidation fermentation polymyxin bacitracin lactose*) contenant de la polymyxine B et de la bacitracine et changeant de couleur en fonction de l'acidification du lactose;
- enfin, le milieu BCSA (*B. cepacia selective agar*) contenant polymyxine B, gentamicine, du cristal violet, vancomycine et extrait de levure.

Les performances des milieux PC et OFBPL sont assez comparables, le milieu PC étant plus inhibiteur, en particulier vis-à-vis des levures et du staphylocoque. Le milieu BCSA, enrichi en extrait de levure et caséine, présenterait l'avantage de permettre une croissance plus rapide de *B. cepacia*, tout en étant plus sélectif que les milieux précédents [194].

L'utilisation de milieux sélectifs a conduit à une augmentation significative de l'isolement du complexe *cepacia* à partir des prélèvements respiratoires. Cependant, d'autres espèces sont susceptibles de pousser sur ces milieux telles que *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea sp.*, et *Ralstonia sp.*, et des tests biochimiques supplémentaires sont nécessaires pour différencier ces espèces de celles du complexe *cepacia*.

- Identification [170]

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif, aérobic strict, mobile, oxydase positive (bien que cette réaction soit souvent faible ou lente avec les réactifs usuels), résistant à la colistine. Les colonies qui apparaissent souvent après 48 heures, peuvent, selon l'espèce, être pigmentées en jaune sur gélose au sang.

Il est nécessaire de réaliser un diagnostic différentiel avec d'autres espèces résistantes à la colistine telles que *B. gladioli*, *B. mallei* et *B. pseudomallei*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.*, et *Chryseobacterium sp.* (les principaux caractères phénotypiques permettant de différencier ces espèces figurent dans le tableau 4 ci-après).

L'identification au moyen de galeries commercialisées (type API20NE) est généralement correcte au niveau du genre. L'individualisation en espèce d'une bactérie appartenant au complexe *cepacia* est difficile si l'on s'appuie uniquement sur des critères phénotypiques dans la mesure où les souches de l'espèce *B. cenocepacia* présentent des caractères phénotypiques extrêmement variables, que les résultats rapportés dans la littérature sont parfois discordants, probablement en raison des techniques utilisées, et que le genre *Burkholderia* est en évolution constante sur le plan taxonomique.

La détermination de l'espèce nécessite par conséquent la mise en œuvre de méthodes moléculaires. Celles-ci sont basées sur les profils de restriction enzymatique de gènes amplifiés par PCR (PCR-RFLP) : ARNr 16S, flagelline, *recA*, ce dernier paraissant le plus discriminant.

D'autre part, des techniques de PCR sont en cours de développement dans le but d'améliorer la sensibilité de la détection par rapport à la culture, l'isolement de la bactérie restant bien sûr indispensable pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Des amorces ciblant une séquence spécifique de l'ADNr16S ont été proposées, mais ces techniques ne sont pas encore entrées dans le domaine courant et nécessitent une évaluation complémentaire.

2.4.7. Sensibilité aux antibiotiques [170,171,195,196]

Le comportement habituel des espèces du complexe *cepacia* consiste en une multirésistance quasi-constante vis-à-vis de nombreux antibiotiques tels que la ticarcilline et souvent l'imipénème, les aminosides et les polymyxines (colimycine). Parmi les mécanismes impliqués, on peut noter :

- l'imperméabilité (résistance naturelle aux antibiotiques polycationiques : aminoglycosides, polypeptides, dont le passage à travers la membrane externe nécessite la présence de récepteurs anioniques au niveau du LPS, récepteurs qui sont très peu nombreux chez *B. cepacia*, imperméabilité à l'imipénème),
- la dérégulation de la bêta-lactamase chromosomique (résistance aux bêta-lactamines),
- les mécanismes d'efflux (quinolones).

Les antibiotiques les plus actifs *in vitro* sont parmi les bêta-lactamines : la pipéracilline, la ceftazidime, le méropénème et la témocilline (bêta-lactamine stable vis-à-vis des bêta-lactamases), et parmi les autres antibiotiques : le cotrimoxazole et la minocycline. La ciprofloxacine est assez rarement active.

2.5. Autres bacilles à Gram négatif non fermentants, présentant une résistance à la colistine, et pouvant poser des problèmes d'identification

Plusieurs genres ou espèces de bacilles à Gram négatifs non fermentants, retrouvés au cours de la mucoviscidose, présentent, tout comme les espèces du complexe *cepacia*, une résistance naturelle à la colistine, et sont par conséquent susceptibles de pousser sur les milieux sélectifs pour *Burkholderia cepacia*. La différenciation entre ces diverses espèces n'est pas toujours aisée.

Les principaux caractères phénotypiques, permettant de les différencier figurent dans le tableau suivant (tableau 4) [197,198].

Ainsi, les espèces du complexe *cepacia* doivent être différenciées de l'espèce :

- *B. gladioli* (ne cultive pas ou mal sur BCSA, oxydase -, LDC-, n'acidifie ni le maltose, ni le lactose à la différence de *B. cepacia sensu lato*)

- *B. mallei* et *B. pseudomallei* (dont l'ADH est positive)

- *Ralstonia pickettii* (qui cultive sur BCSA, est LDC-, ONPG-, nitrates réductase -) et *R. mannitolilytica*.

- *Inquilinus sp.* (LDC -, ODC-)

- *Chryseobacterium sp.* (immobile).

Ces différentes espèces sont décrites dans la suite de ce chapitre.

	Complexe <i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>	<i>Pandoraea sp.</i>	<i>R. pickettii</i>	<i>R. mannitolilytica</i>	<i>Inquilinus sp.</i>	<i>Chryseobacterium sp.</i>
oxydase	+ (lente et faible)	V	V	+	V	+	+	+	+
flagelles	>2	>2	0	>2	I	>1	>1		0
pigment	(jaune)								jaune
Oxydation du saccharose	V	-			-	-		-	
LDC	V	-			-	-		-	
ODC	V	-			-	-		-	
ONPG	V	+			-	-			V
Hydrolyse du tween 80	+	+			-	+			V
Réduction des nitrates	V	V	+	+	V	+	-		V
Pousse sur BCSA	+	(-)			+	+	+	-	+
Acidification maltose	(+)	-			-	(+)			
Acidification lactose	(+)	-			-	(+)			-
ADH	-	-	+	+	+	-			
colistine	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Hydrolyse gélatine	V	V	-	+	-	V			+
Hydrolyse esculine	V	-	-	V	-	-			+
Production d'indole	-								V

Tableau 4: Principales caractéristiques phénotypiques permettant de différencier les bacilles à Gram négatif non fermentants résistants à la colistine et rencontrés au cours de la mucoviscidose. (+) (-) : majorité des souches positives ou négatives, LDC : lysine décarboxylase, ODC : ornithine décarboxylase, ONPG : bêta-galactosidase (Ortho nitro phényl galactopyranoside), ADH : arginine dihydrolase.

2.5.1 *Burkholderia gladioli*

Burkholderia gladioli, précédemment nommé *Pseudomonas gladioli* ou *Pseudomonas marginata*, a été décrit pour la première fois par McCulloch en 1921 comme un phytopathogène à l'origine d'une maladie chez les glaïeuls et d'autres plantes.

Initialement considéré comme un commensal inoffensif pouvant parfois coloniser le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, *B. gladioli* a récemment été associé à des infections pulmonaires chez les mucoviscidosiques [199] ainsi que chez des patients immuno-compromis. Des cas de pneumonies et de sepsis sévère ont été attribués à cette bactérie chez des patients atteints de granulomatose chronique [200].

La contribution de cette bactérie dans l'évolution clinique de la mucoviscidose n'est toujours pas clarifiée. En 2001, Jones et col. ont décrit le cas d'un patient mucoviscidosique, infecté par *B. gladioli*, qui présentait une infection pulmonaire chronique et de multiples abcès des tissus mous [201]. D'autre part, au cours d'une étude rétrospective sur 6 ans concernant 33 patients atteints de mucoviscidose, Kennedy et col. ont montré que la colonisation par cette bactérie était le plus souvent transitoire et compatible avec des résultats satisfaisants en post-transplantation pulmonaire [202].

En 2006, d'après les données de l'Observatoire Cepacia, une colonisation à *B. gladioli* a été déclarée par cinq centres de soins chez six patients âgés de 11 à 30 ans. Parmi ces six déclarations, quatre cas étaient nouveaux et dans un cas, il s'agissait d'une recolonisation. Un état stable a été noté chez quatre patients évaluable (les deux autres ayant été colonisés fin 2006).

Burkholderia gladioli présente tous les caractères du genre *Burkholderia*. C'est un bacille à Gram négatif, mobile (à 20 °C) grâce à des flagelles polaires, accumulant des granules de poly-bêta-hydroxybutyrate, aérobie, catalase positive. L'oxydase est généralement négative (en cas de positivité, la réponse est très faiblement positive), et cette espèce est chimio-organotrophe, à métabolisme oxydatif, et n'acidifie ni le lactose, ni le maltose.

Il a été montré que l'identification de *B. gladioli* et sa différenciation des espèces du complexe *cepacia* par des méthodes phénotypiques ne sont pas fiables : en effet, au sein du laboratoire BcRLR, environ 1100 souches identifiées préalablement comme des espèces du

complexe *cepacia* ont été testées et un taux d'identifications incorrectes de 10% a été mis en évidence dont 50% appartenaient en fait à l'espèce *B. gladioli*. [203] ; de même six souches de *B. gladioli*, qui ont été associées à une transmission nosocomiale dans l'hôpital d'Auckland, se sont avérées être en fait des souches de *B. cenocepacia* [204].

Les méthodes phénotypiques doivent donc être confirmées par des méthodes moléculaires. Ces dernières sont fondées sur des signatures spécifiques au niveau de l'ADNr 16S et/ou 23S : méthode ARDRA (Segonds [205]), PCR spécifiques d'espèces (Bauernfeind et col. [206], Whitby et col. [207]).

Un test d'orientation utile pour différencier les membres du complexe *cepacia* et *B. gladioli* est la sensibilité aux aminosides présentée par *B. gladioli*.

2.5.2. Autres espèces du genre *Burkholderia*

D'autres espèces du genre *Burkholderia* peuvent être trouvées de façon occasionnelle chez des patients mucoviscidosiques, notamment l'espèce *B. pseudomallei*, agent de la méliodose et qui semble être acquise au cours de voyage dans des zones où cette bactérie sévit [208,209], et *B. fungorum* (bactérie du sol) [210].

2.5.3 Les espèces du genre *Ralstonia*

a) Taxonomie du genre *Ralstonia*

Le genre *Ralstonia* appartient à la famille des *Burkholderiaceae*, placée dans l'ordre des *Burkholderiales* appartenant à la classe des *Betaproteobacteria*. Il a été proposé par Yabuuchi et col. en 1995 puis validé en avril 1996, et comportait 14 espèces [211]. Neuf membres du genre *Ralstonia* ont été ensuite reclassés par Vandamme et Coenye dans le genre *Cupriavidus* qui comporte les espèces suivantes : *C. basilensis*, *C. gilardii*, *C.s pauculus*, *C. oxalaticus*, *C. campinensis*, *C. metallidurans*, *C. taiwanensis*, *C. respiraculi*, *C. necator*, et *C. pinatubonensis* [212,213]. Le genre *Ralstonia* comporte cinq espèces : *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia insidiosa*, et *Ralstonia syzygii*.

Les espèces du genre *Cupriavidus* sont sensibles à la colistine, alors que celles du genre *Ralstonia* sont résistantes et peuvent être confondues avec les espèces du complexe *B. cepacia*.

b) Caractéristiques bactériologiques

Les *Ralstonia* spp. sont des bacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles, aérobies, à métabolisme respiratoire, oxydase et catalase positives, ne présentant pas de lysine décarboxylase ni d'activité bêta-galactosidasique [213].

Le genre *Cupriavidus* rassemble des bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche, chimiohétérotrophes ou chimiolithotrophes, à métabolisme respiratoire, pouvant utiliser plusieurs acides aminés comme unique source de carbone et d'azote, catalase et oxydase positives, résistants à plusieurs métaux dont le cuivre.

c) Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces des genres *Ralstonia* et *Cupriavidus* sont retrouvées dans une importante variété de niches écologiques incluant les plantes et le sol contaminé par des métaux lourds.

Certaines espèces sont phytopathogènes, c'est le cas de *Ralstonia syzygii* qui est pathogène pour les plantes du genre *Syzygium* et notamment pour *Syzygium aromaticum* (giroflief) et de *Ralstonia solanacearum* qui est une bactérie phytopathogène d'une importance considérable car elle est pathogène pour plus de 200 espèces de plantes (tomate, pomme de terre, tabac, bananier et arachide) [214].

Cupriavidus necator, *C. oxalaticus*, *C. basilensis*, *C. campinensis* et *C. metallidurans* sont retrouvées dans l'environnement ; parmi ces espèces, certaines pourraient jouer un rôle dans la remédiation biologique de sols et d'eaux contaminés par des métaux lourds ou des composés organiques chlorés [215,216].

Bien que chez les individus en bonne santé, les infections à *Ralstonia sp./Cupriavidus sp.* soient extrêmement rares, *R. pickettii*, *R. mannitolilytica*, *C. gilardii*, *C. pauculus*, *C. taiwanensis* et *C. respiraculi* ont été isolées à partir de divers sites (méningite, ostéomyélite) chez des malades immunodéprimés et ont été incriminées dans des infections nosocomiales.

Plus particulièrement, *R. pickettii* est présent au niveau du sol, de l'eau et des plantes et peut constituer un commensal de la cavité orale et du tractus respiratoire supérieur [213]. Parmi les espèces du genre *Ralstonia*, c'est l'espèce la plus souvent rencontrée en médecine humaine [217]. Chez les individus immunodéprimés, cette espèce peut être à l'origine d'infections principalement respiratoires, mais aussi de bactériémies [213,218]. Des études ont montré que l'infection du tractus respiratoire chez ces individus n'avait pas de signification clinique [219,220]. Les solutions médicales contaminées constituent une des principales sources de *R. pickettii*. Des bactériémies à *R. pickettii* ont été associées à des infections de voies veineuses centrales ou de 'port-a-cath', secondaires à l'utilisation de telles solutions, ainsi qu'à des pseudobactériémies, secondaires à des solutions utilisées au laboratoire [219-227].

Plusieurs épidémies d'infections nosocomiales (méningites récurrentes, bactériémies) ont été associées à *R. mannitolilytica* [217,228-230].

C. pauculus et *C. gilardii* ont été isolées de façon sporadique à partir d'échantillons humains (liquide céphalorachidien, plaies, moelle épinière, tractus respiratoire) [231,232].

R. pickettii, *R. mannitolilytica*, *R. insidiosa*, *C. gilardii*, *C. taiwanensis*, et *C. respiraculi* ont été retrouvées dans les sécrétions respiratoires de patients mucoviscidosiques [211]. *C. insidiosa* et *C. respiraculi* ont d'ailleurs été récemment identifiées pour la première fois à partir d'isolats issus de ces patients.

d) Epidémiologie des genres *Ralstonia*/*Cupriavidus* dans la mucoviscidose

En raison de la taxonomie instable des espèces du genre *Ralstonia* et du manque de méthodes de diagnostic rapide et fiable, la prévalence et le rôle clinique de ces espèces n'ont pas pu être explorés pour l'instant. La prévalence de ces germes semble cependant être relativement faible : d'après l'étude de Burns et col. réalisée au cours d'un essai de phase III d'un aérosol de tobramycine, seulement deux patients parmi 559 présentaient *R. pickettii* dans leurs expectorations [143].

Parmi les 4000 isolats issus de patients mucoviscidosiques et reçus par le laboratoire BcRLR entre 1997 et 2002, Coenye et col. ont identifié 42 isolats appartenant aux genres *Ralstonia* et *Cupriavidus* (38 patients) [213]. Ces isolats étaient répartis de la façon suivante : 25 *R. mannitolilytica*, 9 *R. pickettii*, 2 *C. gilardii*, 1 *C. taiwanensis*, et 5 isolats dont l'espèce n'est pas encore déterminée. 81% de ces isolats ont poussé sur milieu BCSEA. Dans la mesure où, au cours de cette étude, les isolats ne provenaient pas de patients se trouvant dans le même centre, aucune preuve de transmission croisée n'a pu être fournie. Trois patients présentaient une colonisation persistante.

En 2005, Coenye et col. ont étudié la répartition des diverses espèces du genre *Ralstonia* sur un plus grand nombre de patients (111 patients colonisés, 56 centres de soins, 24 villes aux Etats-Unis) et ont à nouveau noté la prédominance de l'espèce *R. mannitolilytica* [211]. Les espèces *R. mannitolilytica* (46.0%), *C. respiraculi* (18.9%) et *R. pickettii* (18.0%) constituaient les espèces les plus fréquemment rencontrées. Ils ont également mis en évidence les espèces suivantes : *C. gilardii* (9.0%), *R. insidiosa* (1.8%), *C. metallidurans* (1.8%), *C. basiliensis* (0.9%), *C. pauculus* (0.9%) et *C. taiwanensis* (0.9%).

D'après Ferroni et col. (2002), des espèces du genre *Ralstonia* ont été mises en évidence chez seulement deux patients sur 259 patients suivis dans un même centre de soins [233].

Au cours de l'année 2006, en France, d'après le rapport épidémiologique réalisé par l'Observatoire Cepacia, une colonisation par une espèce du genre *Ralstonia* a été déclarée chez dix patients et la souche a été envoyée à l'Observatoire pour 9 de ces 10 patients. L'espèce *R. mannitolilytica* était, comme dans les études américaines, prédominante (8 patients sur 9). La neuvième souche appartenait à l'espèce *R. pickettii*. Un âge moyen de colonisation de 14 ans (+/- 6 ans), et une colonisation chronique avérée chez 4 patients ont été rapportés. Sept des huit patients étaient suivis en Bretagne, l'analyse comparative de souches par électrophorèse en champ pulsé a donc été réalisée (pour six souches). Celles-ci se répartissent en 4 pulsotypes, deux souches présentant le même pulsotype, une transmission croisée ne peut donc être écartée. La colonisation a été associée à une détérioration clinique chez 4 patients et une septicémie à *R. mannitolilytica* a été observée en suite de transplantation.

e) Identification des espèces du genre *Ralstonia* et *Cupriavidus*

L'identification des espèces du genre *Ralstonia* n'est pas dénuée de difficultés et les erreurs d'identification, notamment avec les espèces des genres *Burkholderia* et *Pseudomonas*, ne sont pas rares [210,213,233]. Les méthodes de diagnostic phénotypiques usuelles -manuelles et automatisées- n'offrent pas de résultats satisfaisants pour l'identification des espèces de ce genre. Or, une identification exacte des espèces rencontrées dans la mucoviscidose est nécessaire pour mieux comprendre leur épidémiologie et leur signification clinique et pour mettre en place des mesures thérapeutiques et de contrôle de l'infection adaptées.

Le séquençage du gène de l'ARN 16S peut être utile pour l'identification de ces espèces, mais nécessite de disposer d'un séquenceur ce qui n'est pas à la portée de tous les laboratoires. Pour faciliter la mise en évidence des bactéries du genre *Ralstonia*, Coenye et col. ont développé différentes méthodes de PCR (basée sur l'ADN ribosomal 16S) permettant d'une part l'identification des isolats appartenant au genre *Ralstonia* et d'autre part l'identification de *R. pickettii*, *R. mannitolilytica*, *R. insidiosa* et *C. respiraculi* [211,213]. Ces

méthodes ont montré une sensibilité et une spécificité tout à fait correctes. De même, Segonds et col. ont montré que la méthode ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) est utilisable pour l'identification des espèces du genre *Ralstonia* [205].

f) Sensibilité aux antibiotiques

Le phénotype de résistance de *R. pickettii* est le plus connu parmi les espèces de ce genre. Cette espèce est relativement plus sensible aux antibiotiques que les espèces appartenant au genre *Burkholderia*. Le phénotype de résistance aux bêtalactamines est assez caractéristique avec, d'une part, une résistance de bas niveau aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) et, d'autre part l'absence de synergie d'associations avec l'acide clavulanique ce qui peut être lié à la production d'une oxacillinase chromosomique inductible (OXA-22). On notera la sensibilité à la pipéracilline, la céfoxitine, au céfuroxime et à d'autres céphalosporines (céphalosporines de troisième génération par exemple) ou encore à l'imipénème. Pour les autres antibiotiques, il y a une résistance naturelle aux polymyxines (colistine) et aux aminosides mais une sensibilité habituelle au sulfaméthoxazole ou encore à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones. La résistance acquise aux bêtalactamines dont l'imipénème serait en relation avec la présence d'une deuxième enzyme inductible de type OXA (OXA-60) [235].

En conclusion, diverses espèces du genre *Ralstonia*, dont la plus fréquente est *R. mannitolilytica*, ont été isolées de patients mucoviscidosiques. La prévalence de ces espèces demeure mal connue bien qu'elle semble être relativement faible, et la transmissibilité et la pathogénicité devront être évaluées sur un plus grand nombre de cas.

2.5.4. Les espèces du genre *Pandoraea*

a) Taxonomie du genre *Pandoraea*

Le genre *Pandoraea* fait partie de la famille des *Burkholderiaceae*, de l'ordre des *Burkholderiales* et de la classe des *Betaproteobacteria* et est phylogénétiquement proche du genre *Burkholderia*.

En 2000, Coenye et col. [236] ont étudié diverses souches de bacilles à Gram négatif non fermentants ayant posé des problèmes d'identification à différents laboratoires de routine aux USA, au Canada et au Brésil. Ces souches provenaient principalement de sujets mucoviscidosiques et du sol ; elles ont été identifiées à l'aide de méthodes phénotypiques, par les laboratoires de routine, comme appartenant aux espèces *B. cepacia*, *R. pickettii* et *C. pauculus*.

L'étude taxonomique de ces souches basée sur diverses techniques (biochimiques et moléculaires) a montré l'existence d'un nouveau genre, nommé *Pandoraea* en référence à la boîte de Pandore de la mythologie grecque, en raison de la diversité génétique des organismes faisant partie de ce nouveau genre.

Dans cette étude, Coenye et col. ont défini cinq espèces ainsi qu'une espèce génomique à laquelle aucun nom n'a été donné :

- *P. pnomenusa*, *P. sputorum*, *P. pulmonicola*, *P. apista*, principalement isolées chez des patients mucoviscidosiques ;
- *P. norimbergensis* anciennement nommée *Burkholderia norimbergensis* (Wittke et al. 1997) et isolée à partir d'une hémoculture, de lait en poudre, d'eau de l'environnement et d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire humain
- la genomospécies *Pandoraea sp* isolé à partir du sol.

Plus récemment, l'étude taxonomique du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) a démontré que neuf bactéries précédemment intégrées dans le groupe WO-2 (CDC weak oxidizer group 2) appartenaient en fait aux espèces *P. apista*, *P. pnomenusa*, et à trois nouvelles genomospécies [237].

Le genre *Pandoraea* comporte donc actuellement 5 espèces *P. pnomenusa*, *P. sputorum*, *P. pulmonicola*, *P. apista*, et *P. norimbergensis* ainsi que quatre genomospecies : la genomospecies 1 anciennement nommé *Pandoraea sp.* et les genomospecies 2,3 et 4.

b) Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Pandoraea* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à un [236] ou plusieurs [237] flagelles polaires, catalase positive, oxydase variable, produisant une phosphatase alcaline et une leucine arylamidase et capables de croître sur une gélose de Drigalsky en présence de 1,5% de NaCl. Les tests suivants sont négatifs : réduction des nitrates, bêta-galactosidase, indole, DNase, hydrolyse de l'esculine, hydrolyse de la gélatine et hydrolyse du Tween 80.

Toutes les souches étudiées par Coenye et col. [236] hormis la souche appartenant à la genomospecies 1 et l'ensemble des souches de l'étude de Daneshvar et col. [237] hormis une souche de *P. apista* ont poussé sur les milieux sélectifs pour *B. cepacia* à 37°C.

c) Habitat, rôle pathogène et épidémiologie

Les espèces du genre *Pandoraea spp.* ont été isolées principalement des sécrétions respiratoires de patients mucoviscidosiques, mais ont également été retrouvées dans d'autres échantillons cliniques (hémocultures, liquide bronchique, sinus maxillaire), au niveau du sol, de l'eau et d'aliments [236-239].

En 2003, Jorgensen et col. [240] ont décrit une épidémie à *P. apista* chez six patients mucoviscidosiques ayant fréquenté le même camp d'hiver. Ces patients ont tous développé une colonisation chronique avec un taux élevé d'anticorps. Quatre patients ont présenté une détérioration de la fonction respiratoire qui a été associée à la colonisation par *P. apista*. Au vu de cette épidémie, l'isolement des patients atteints par les espèces du genre *Pandoraea* a été recommandé [240,241].

Le caractère chronique de la colonisation a également été décrit par Atkinson et col. qui ont trouvé des souches identiques au cours du temps, chez deux patients ayant présenté des cultures positives à *P. apista* pendant plusieurs années et ceci en dépit de traitements antibiotiques [242].

Un cas de bactériémie à *Pandoraea* a été décrit chez un patient mucoviscidosique en 2004 [238].

Les facteurs de virulence du genre *Pandoraea* sont encore mal connus. Une étude in vitro sur 17 souches appartenant aux cinq espèces et à deux genomospecies a montré que peu de souches sont susceptibles d'envahir les cellules épithéliales pulmonaires et de former des biofilms. Par contre, l'ensemble des souches ont provoqué une réponse immunitaire marquée avec une élévation des taux d'IL6 et IL8 nettement supérieure à l'élévation notée avec une souche témoin d'*E. coli* [243].

En France, d'après les données de l'Observatoire Cepacia 2006, trois cas de primocolonisations ont été déclarés dans trois centres différents chez des patients âgés de 37, 16, et 15 ans dont l'état clinique a été jugé stable. Deux souches appartenaient au groupe *sputorum-pnomenusa*, et une au groupe *apista-pulmonicola*.

d) Identification des espèces du genre *Pandoraea*

En raison de la difficulté de l'identification des espèces du genre *Pandoraea* par les méthodes phénotypiques, des techniques moléculaires ont été développées:

- Coenye et col. ont mis au point des PCR basées sur l'ADN ribosomal 16 S permettant d'identifier le genre *Pandoraea* ainsi que les espèces *P. pnomenusa*, *P. sputorum*, *P. norimbergensis* et le groupe *P. apista / P. pulmonicola* [244].
- La technique ARDRA développée par Segonds et col. permet d'identifier l'espèce *P. norimbergensis* et les groupes *P. pnomenusa* et *P. sputorum*, et *P. pulmonicola* et *P. apista* [245].
- L'analyse du gène *gyrB* par RFLP et séquençage semble prometteuse pour l'identification de ces espèces [246].

e) Sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries du genre *Pandoraea* sont résistantes à la colistine, à la ticarcilline, au chloramphénicol et aux aminosides. La résistance aux fluoroquinolones est variable. Elles sont sensibles à l'imipénème et résistantes au méropénème ; cependant une carbapénémase hydrolysant l'imipénème a été récemment décrite chez *P. pnomenusa*. Les autres molécules actives sont la piperacilline (modérément active), le cotrimoxazole et les cyclines [247].

En conclusion, les espèces du genre *Pandoraea* ont été principalement isolées d'échantillons issus de patients mucoviscidosiques. Ce genre est connu depuis peu, et pose des problèmes d'identification, les méthodes phénotypiques s'avérant insuffisantes. Son incidence semble cependant être relativement faible. La transmissibilité et la pathogénicité des espèces de ce genre devront être évaluées sur un plus grand nombre de cas.

2.5.5. Le genre *Inquilinus*

Le nouveau genre *Inquilinus*, qui appartient à la classe des α -*proteobacteria*, a été décrit en 2002 par Coney et col. [210], au cours de l'étude, par diverses méthodes (analyse des acides gras, caractérisation biochimique, séquençage de l'ADNr 16S, hybridation ADN-ADN), d'une collection de 51 bactéries à Gram négatif inhabituelles isolées de patients mucoviscidosiques. Huit isolats ont été classés dans le genre *Inquilinus*, dont sept appartenaient à la nouvelle espèce *Inquilinus limosus* et un isolat à une espèce ne possédant pas encore de nom.

Le genre *Inquilinus* regroupe des bacilles à Gram négatif, présentant les caractéristiques suivantes [210] :

- Culture possible entre 25 et 42°C,
- Présence d'une activité catalase, lipase, phosphatase, *N*-acetylglucosaminidase, β -glucosidase, proline aminopeptidase, pyrrolidonyl aminopeptidase, tryptophane aminopeptidase, et *N*-benzyl-arginine aminopeptidase,
- Absence d'activité lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, et arginine dihydrolase,
- Pas de production de pigment ni d'indole ni d'H₂S, pas de dénitrification
- Absence d'utilisation de glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdaline, arabinose, et citrate.

Récemment, des équipes française et allemandes ont décrit plusieurs cas de patients mucoviscidosiques (n=12), chez lesquels des isolats appartenant au genre *Inquilinus* ont été retrouvés (Chiron et col. 2005 (n=5) [248]; Wellinghausen et col. 2005 (n=2) [249]; Schmoltdt et col. 2006 (n=6, une patiente suivie dans cette étude faisait également partie de l'étude de Wellinghausen et col.)[250]). Ces isolats ont été identifiés par analyse de l'ARNr 16S (ARDRA et/ou séquençage).

Parmi les 12 patients, l'âge d'acquisition d'*Inquilinus* était situé entre 8 et 32 ans, 11 patients présentaient une colonisation associée par *P. aeruginosa*, 6 par *Aspergillus fumigatus*, 6 par *S. aureus*, 4 par *Candida albicans*, 3 par *Stenotrophomonas maltophilia*, et 1 par *Achromobacter xylosoxidans*.

Une colonisation transitoire par une souche d'*Inquilinus* non mucoïde a été mise en évidence chez un patient, alors que 11 patients ont présenté une colonisation persistante (au moins deux prélèvements positifs) par des souches mucoïdes. Une exacerbation aiguë ou une détérioration spirométrique sans signes d'exacerbation ont été rapportées pour 9 patients, parmi lesquels un ne présentait pas de colonisation associée [248].

Les trois études ont montré que les patients portaient des souches distinctes et l'étude des isolats successifs a montré que les patients présentaient le même clone au cours du temps.

Les espèces du genre *Inquilinus* sont caractérisées par un temps de pousse relativement long sur les milieux de routine et sur les milieux spécifiques pour *B. cepacia* (jusqu'à 6 jours). D'après Chiron et col., les bactéries du genre *Inquilinus* sont susceptibles de pousser sur les milieux OFBP et PC (milieux spécifiques pour les bactéries du complexe *cepacia*) mais ne poussent pas sur milieu BCSA. Quelques différences de caractères biochimiques par rapport à ceux décrits par Coenye et col. (assimilation des sucres, réduction des nitrates, catalase) ont été notées.

D'après Schmoldt et col., la détection d'isolats d'*Inquilinus limosus* s'accompagne d'une réponse anticorps spécifique qui pourrait refléter le potentiel pathogène de ce germe. La détection de ces anticorps pourrait être utile à la mise en évidence précoce de ce germe et pourrait favoriser son identification.

Les souches d'*Inquilinus* étudiées à ce jour présentent une multirésistance aux antibiotiques : elles sont résistantes aux pénicillines et aux céphalosporines (certaines souches montrent cependant une sensibilité variable à la ceftazidime), à la kanamycine, à la tobramycine, à la doxycycline, à la fosfomycine, à la colistine et au cotrimoxazole. Elles sont sensibles à l'imipénème et à la ciprofloxacine, et présentent une sensibilité variable envers l'amikacine, la gentamycine, le méropénème et la rifampicine [248-250].

Les isolats du genre *Inquilinus* pose des problèmes d'identification dans les laboratoires de routine. Ainsi, dans l'étude de Schmoldt et col., les isolats ont été initialement identifiés en tant que *P. aeruginosa* en raison de leur caractère mucoïde et de l'activité oxydase positive. De plus, le genre *Inquilinus* ne fait pour l'instant pas partie de la base des données des kits commerciaux. L'identification de ces bactéries par l'utilisation de ces kits est donc inévitablement erronée. Ainsi, la galerie API 20 NE classe les isolats de ce genre comme

Sphingomonas paucimobilis (3 isolats sur huit testés avec un profil douteux) ou comme *Sphingomonas paucimobilis/ Agrobacterium radiobacter* (5 isolats) [248,249]. La galerie ID32GN peut rendre un profil indéterminé (4 isolats sur 6 testés), ou *P. fluorescens/ B. cepacia* (1 isolat) ou *Klebsiella sp.* (1 isolat). Ces identifications doivent apparaître au biologiste comme non satisfaisantes en raison de la haute résistance aux bêtalactamines et de la morphologie des colonies des espèces de ce genre (pas de pigment jaune caractéristique de *S. paucimobilis*).

En conclusion, le genre *Inquilinus* a été récemment décrit, et a été le plus souvent isolé à partir de patients mucoviscidosiques. A ce jour, l'habitat naturel, la signification clinique et la source de contamination demeurent inconnus. Pour l'instant, aucun cas de transmission croisée n'a été mis en évidence. Les patients colonisés de façon chronique sont tous porteurs de souches mucoïdes. Cette observation suggère que les souches du genre *Inquilinus*, de la même façon que les souches de *P. aeruginosa*, pourraient subir une conversion phénotypique en souches mucoïdes, ce qui permettrait la formation de biofilm et ce qui conduirait à une colonisation chronique difficilement éradicable. L'aspect mucoïde retrouvé dans la plupart des cas décrits, ainsi que la résistance à la colistine et à la plupart des bêtalactamines excepté l'imipénème (sensibilité importante avec un grand diamètre) constituent de bons critères d'orientation diagnostique, bien qu'ils ne soient pas spécifiques, puisqu'ils sont également concordants avec l'espèce *Ochrobactrum intermedium* [248].

2.5.6. Le genre *Chryseobacterium*

En 1994, Vandamme et col., au cours d'une étude phylogénétique au sein de la famille des *Flavobacteriaceae*, ont montré que *Flavobacterium balustinum*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum*, *F. meningosepticum* et *F. scophthalmum* étaient phylogéniquement proches et ces espèces ont été transférées dans le nouveau genre *Chryseobacterium* [251].

Ultérieurement, de nouvelles espèces ont été placées dans le genre *Chryseobacterium* qui, comme l'écrivent Herzog *et al.* 2008 [252], est l'un des genres dont le nombre d'espèces augmente le plus rapidement. Il comporte actuellement une trentaine d'espèces.

En mai 2005, Kim et col. ont montré que *Chryseobacterium meningosepticum* et *Chryseobacterium miricola* (Li *et al.* 2004 [253]) forment un genre distinct nommé *Elizabethkingia* [254].

Le genre *Chryseobacterium* rassemble des bacilles à Gram négatif, non sporulés, immobiles, aérobies, chimio-organotrophes, oxydase et catalase positives, hydrolysant généralement l'esculine, protéolytiques, n'acidifiant pas le lactose, cultivant à 30 C et souvent à 37 C en donnant des colonies translucides (parfois opaques), circulaires, convexes, lisses, brillantes, typiquement pigmentées en jaune [255]. Une réponse variable selon les espèces est notée pour les tests suivants : croissance sur une gélose de MacConkey, réduction des nitrates, indole, production d'hydrogène sulfuré, hydrolyse de l'urée, hydrolyse du Tween 80, hydrolyse de la tyrosine, acidification des sucres.

Les espèces du genre *Chryseobacterium* ont pour habitat le milieu extérieur (sol, plantes, eau douce, eau de mer, eaux usées), et sont également isolées de divers prélèvements et de denrées alimentaires (lait, produits laitiers, poissons, carcasses de volailles, de porcs, de bœufs, d'agneaux). Plusieurs études environnementales ont mis en évidence la capacité de *Chryseobacterium* à survivre dans les eaux traitées par le chlore [255,256]. Divers systèmes médicaux (respirateurs, sondes trachéales, humidificateurs d'air, incubateurs pour nouveau-né, cathéter intravasculaire, valves prothétiques...) ont été impliqués dans la contamination de patients [256].

Certaines espèces appartenant à ce genre ont été décrites comme étant les agents étiologiques de méningites, bactériémies, pneumonies, endocardites, infections de la peau et des tissus mous, et infections oculaires ; elles constituent des pathogènes opportunistes qui infectent principalement les nouveau-nés et les patients immunocompromis [256].

Elizabethkingia meningosepticum anciennement nommé *Chryseobacterium meningosepticum* revêt une importance particulière chez les nourrissons et les prématurés. Elle peut être la cause de septicémies et de méningites gravissimes à caractère épidémique dans des unités de soins intensifs. Des taux de mortalité de 57% ont été rapportés avec d'importantes séquelles type hydrocéphalie, troubles de l'audition. Cette bactérie est également responsable de pneumonies et septicémies chez les adultes [256].

Entre janvier 2002 et décembre 2006, une équipe italienne menée par Lambiase [255] s'est intéressée aux contaminations par les espèces du genre *Chryseobacterium* chez des patients mucoviscidosiques. Parmi 300 patients inclus dans l'étude, 22 ont présenté des cultures positives à *Chryseobacterium/ Elizabethkingia* : *C. indologenes* présent chez 14 patients, *E. meningosepticum* chez cinq patients, et *C. gleum* chez 3 patients.

Tous ces patients présentaient une colonisation associée à *P. aeruginosa*. Quatre patients ont présenté une colonisation chronique par *C. indologenes* (au moins 3 cultures positives pendant au moins six mois). Une forte hétérogénéité des souches portées par les différents patients a été retrouvée ce qui suggère plutôt une contamination par l'environnement. Les patients colonisés de façon chronique étaient colonisés par la même souche au cours du temps.

Dans cette étude, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la présence de ces bactéries et un impact sur la situation clinique (objectivé par les données spirométriques, la mortalité).

L'ensemble des souches au cours de cette étude ont poussé sur milieux BCSA et aucune sur gélose Mac Conkey. L'identification de toutes ces souches, donnée par l'automate Phoenix, était correcte, et les résultats des galeries API 20 NE étaient correctes pour *C. indologenes* et *C. meningosepticum*, mais ce système n'a pas pu identifier *C. gleum*.

Les espèces du genre *Chryseobacterium* sont caractérisées par une résistance à de nombreux antibiotiques dont les bêtalactamines, les aminosides et les polymyxines. Certaines souches sont résistantes à l'imipénème. Il semble que les antibiotiques les plus actifs sur ces germes soient les nouvelles quinolones (garenoxacine, gatifloxacine, et levofloxacine) suivies par la rifampicine. La ciprofloxacine, le cotrimoxazole peuvent être actifs, et parmi les bêtalactamines, l'agent le plus actif est la pipéracilline associée au tazobactam [255,256].

2.6. Autres bacilles à Gram négatif non fermentants

Au cours de leur étude sur les bactéries inhabituelles retrouvées dans la mucoviscidose, Coneye et col. [210] ont mis en évidence des souches appartenant aux espèces ou genre suivants :

- *Acinetobacter* (deux isolats), ce genre a également été retrouvé dans l'étude de Paschoal et col. [257];
- *Bordetella hinzii* (un isolat), cette bactérie est principalement isolée au cours de maladies respiratoires dans les élevages de volaille, elle a été retrouvée (deux souches différentes) pendant trois ans chez un patient mucoviscidosique ayant subi plusieurs exacerbations pulmonaires [258] ;
- *Comamonas testosteroni* (deux isolats), cette espèce est retrouvée dans l'environnement, et n'est pas associée à des pathologies humaines ;
- *Herbaspirillum sp.* (deux isolats) (ce genre fait l'objet de la quatrième partie) ;
- *Moraxella osloensis* (un isolat), cette espèce a été associée à des infections humaines (méningite, arthrite, endocardite), et a été retrouvée dans l'environnement hospitalier et au niveau du tractus respiratoire de sujets sains ;
- *Rhizobium radiobacter* (quatre isolats), responsable d'infection chez des patients présentant un cathéter et chez des patients immunocompromis ;
- *Xanthomonas sp.* (un isolat), ce genre est connu en tant que phytopathogène et n'a pas, jusqu'ici, été isolé chez l'homme.
- *Alcaligenes faecalis*
- *Pseudomonas fluorescens*.

Enfin, *Bordetella bronchiseptica* a été identifié comme l'agent étiologique d'épisodes récurrents d'exacerbations pulmonaires et de pneumonie chez une patiente mucoviscidosique [259].

3- DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DE LA COLONISATION/INFECTION RESPIRATOIRE

3.1. Modalités de prélèvement [73,260]

Une surveillance bactériologique régulière et adaptée selon l'âge et la gravité de l'atteinte respiratoire, débutant dès le diagnostic de mucoviscidose, et à chaque consultation (périodicité : 1 et 3 mois), est recommandée.

Différents prélèvements bactériologiques sont réalisables:

- le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) réalisé au cours d'une fibroscopie bronchique, est le prélèvement bactériologique de référence, mais c'est un examen invasif qui nécessite souvent une sédation, et n'est pas indemne de morbidité. Il ne peut être répété aisément.
- Le prélèvement oropharyngé par écouvillonnage n'est pas encore validé. Il ne doit être réalisé que chez les jeunes enfants pour lesquels le recueil des expectorations est irréalisable. La comparaison des prélèvements oropharyngés avec le lavage bronchoalvéolaire démontre des valeurs prédictives positives de 57 à 83% pour *P. aeruginosa* et de 27 à 91% pour *S. aureus*. Il apparaît que ces valeurs sont plus faibles avant l'âge de 18 mois. Elles dépendent également de la densité bactérienne dans le prélèvement.
- Le recueil des sécrétions bronchiques est la méthode non invasive à privilégier. Il peut être réalisé spontanément, après une séance de kinésithérapie ou après induction par sérum hypertonique.

3.2. Examen cyto-bactériologique des expectorations [73]

L'examen cyto-bactériologique des expectorations nécessite une procédure spécifique aux patients atteints de mucoviscidose et des recommandations ont été diffusées par la Société Française de Microbiologie.

La qualité du prélèvement est évaluée par la coloration de Gram selon les critères microscopiques habituels (Murray-Washington): rapport entre le nombre de polynucléaires neutrophiles et le nombre de cellules épithéliales pharyngées. La flore bactérienne présente est

décrite. Chez les enfants, les échantillons ne répondant pas aux critères de qualité (absence de polynucléaires neutrophiles) ne sont pas considérés comme impropres à l'analyse. Cependant, la mauvaise qualité du prélèvement doit être signalée afin qu'un autre échantillon soit éventuellement adressé au laboratoire.

Les échantillons sont homogénéisés dans une solution fluidifiante pour expectorations. Un volume de 20 µl d'homogénat est ensuiteensemencé tel quel (seuil de détection 10² UFC/ml) et à une dilution au 1/1000 (seuil de détection de 10⁵ UFC/ml) sur les milieux de culture suivants (voir tableau 5) :

- Echantillon non dilué (seuil de 10² UFC/ml) :
 - Gélose sélective pour la croissance des bacilles à Gram négatif (BCP, Mac Conkey...),
 - Gélose sélective permettant la croissance de *P. aeruginosa* (gélose au cétrimide, par exemple),
 - Gélose sélective pour la croissance des espèces du complexe *B. cepacia* (type PC, OFBPL, BCSA),
 - Gélose sélective permettant la croissance de *S. aureus*, y compris des variants à petites colonies (mannitol hypersalée, milieux chromogènes)
 - Gélose permettant la croissance des champignons (*Candida sp.*, *Aspergillus sp.*)
- Echantillon dilué au 1/1000 (seuil 10⁵ UFC/ml) :
 - Gélose au sang de type Columbia incubée sous 5-10% de CO₂ permettant notamment la croissance *S.pneumoniae*, *S. aureus*,
 - Gélose au sang cuit avec bacitracine incubée sous 5 à 10% de CO₂ permettant la croissance d' *Haemophilus*.

Tous les milieux sont incubés 72 heures à environ 35°C (jusqu'à 5 jours pour le milieu sélectif *B.cepacia*) et une première observation doit être réalisée au minimum à 24h et 48h.

On peut noter que les variants à petites colonies de *S. aureus* ou de *P.aeruginosa* sont plus faciles à détecter sur gélose au sang après 2 à 3 jours d'incubation.

Certains milieux sélectifs pour *S. maltophilia* peuvent être ajoutés au panel précédent (tableau 5).

Bactéries	Milieux recommandés
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman (mannitol-sel) Gélose CNA (colistine acide nalidique)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gélose au sang de cheval ou gélose chocolat /bacitracine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose Mac Conkey, BCP... Gélose cétrimide
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	BCSA (<i>B. cepacia</i> selective agar) Gélose OFPBL (oxidative-fermentative polymixin B-bacitracin-lactose) Gélose PC (<i>Pseudomonas cepacia</i>)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Gélose Mac Conkey, BCP... Gélose VIA (vancomycin-imipenem-amphotericin) Gélose DNase pour la confirmation
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Gélose Mac Conkey, BCP ...
Autres bactéries à Gram positif	Gélose au sang de mouton
Autres bactéries à Gram négatif	Gélose Mac Conkey, BCP...

Tableau 5 : Milieux sélectifs recommandés pour l'isolement des germes dans les prélèvements respiratoires CF. Modifié d'après Gibson et col. 2003 [23].

Les résultats tant qualitatifs que quantitatifs demeurent cependant opérateur-dépendants et sont influencés par la qualité du prélèvement, qui doit être bronchique et non salivaire. Par ailleurs, la viscosité élevée de l'expectoration rend l'analyse assez peu reproductible, malgré les divers procédés de liquéfaction du mucus. Enfin, un dernier facteur de variabilité, et non des moindres, concerne l'hétérogénéité même de la flore bactérienne qui est fragmentée en sous-populations dans différents territoires pulmonaires par l'obstruction des bronches et des bronchioles. Pour toutes ces raisons, les numérations bactériennes doivent être prises comme des données semi-quantitatives plus que réellement quantitatives.

La sérotypie de *P. aeruginosa* présente peu d'intérêt (beaucoup de souches dont toutes les souches mucoïdes, ne sont pas typables). En revanche, le caractère muqueux ou non des souches est d'un réel apport pour le clinicien et doit être mentionné. De même, la présence de

variants à petites colonies de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* doit être précisée sur les comptes-rendus.

L'identification des bactéries isolées en particulier celle des bacilles à Gram négatif non fermentants peut être difficile. Celle-ci nécessite parfois la réalisation de tests biochimiques classiques ou la mise en œuvre de techniques moléculaires, pour confirmer le résultat des méthodes commerciales.

4- DIFFICULTES D'IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTANTS DANS LA MUCOVISCIDOSE

Comme nous l'avons vu précédemment, les bacilles à Gram négatif non fermentants sont fréquemment isolés chez les patients atteints de mucoviscidose au stade chronique. La plupart des études épidémiologiques ont montré la nette prédominance de *Pseudomonas aeruginosa*, suivi de *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans*. D'autres espèces telles que *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea sp.*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.* et *Chryseobacterium sp.* sont plus rarement rencontrées.

L'identification précise de l'espèce est indispensable car ces bactéries ont un pouvoir pathogène et une capacité de transmission variable, rendant importante leur identification au niveau de l'espèce pour la prise en charge de ces patients. En effet, l'isolement de *P. aeruginosa*, fréquemment associé à une détérioration pulmonaire, est un facteur de mauvais pronostic. *B. cepacia* peut être à l'origine de pneumopathies nécrosantes rapidement mortelles ; certains clones de cette espèce sont hautement transmissibles et ont été à l'origine d'épidémies : tout diagnostic de colonisation par ces bactéries déclenche la mise en place de mesures de prévention de la transmission croisée.

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont généralement identifiés par des techniques phénotypiques classiques, mais ces méthodes sont souvent insuffisantes pour les souches isolées au cours de la mucoviscidose, du fait des caractères particuliers de ces souches en culture (mucoïdes, variants à petites colonies) et de la modification de leurs caractères biochimiques. C'est par exemple le cas de certaines souches du complexe *B. cepacia* chez lesquelles l'activité oxydasique n'est pas mise en évidence ce qui peut entraîner des erreurs d'identification par la galerie API20NE qui prend en compte le résultat de l'oxydase [261], et des souches mucoïdes de *P. aeruginosa*, chez lesquelles on peut parfois noter une perte de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS), une perte de mobilité dépendante du flagelle et des pili, et une perte de la production de pyocyanine et d'exoenzymes (DNase, élastase) [95]. L'apparition de ces déficients métaboliques, possédant un haut niveau de résistance aux antibiotiques, pourrait être liée aux fortes concentrations

obtenues in situ lors des traitements par de fortes doses d'aminosides et de colistine en aérosols, souvent employés dans la mucoviscidose.

Les méthodes d'identification phénotypique du commerce ne permettent pas toujours de préciser l'espèce, voire le genre bactérien et ceci d'autant plus que certaines espèces ou genres, de description récente, ne font pas partie de la base de données des systèmes commerciaux.

Les laboratoires sont de plus en plus souvent confrontés à ces souches d'identification difficile, ce qui est lié à l'incubation prolongée des cultures et à l'utilisation de milieux sélectifs qui permettent de mettre plus facilement en évidence ces bactéries. En effet, à côté des souches du genre *Burkholderia*, les souches de *Ralstonia sp*, *B. gladioli*, *Pandoraea sp*, *Inquilinus sp.*, *Chryseobacterium sp.*, les souches multirésistantes de *A. xylosoxydans*, *S. maltophilia.*, et les rares souches de *P. aeruginosa* résistantes à la colistine, qui pourraient passer inaperçues sur les milieux moins sélectifs, peuvent croître sur les milieux sélectifs pour *B. cepacia* [194]

Des études récentes ont montré la faible performance des systèmes commerciaux pour l'identification des BGN non fermentants retrouvés dans le cadre de la mucoviscidose :

- Kiska et col. (1995) [264] ont testé les performances de quatre systèmes (RapID NF Plus, API Rapid NFT (remplacé par API20NE), Vitek GNI et Remel, Uni-N/F Tek and N/F Screen) pour l'identification de diverses espèces de BGN non fermentants (complexe *B. cepacia* , *S. maltophilia*, *A. xylosoxydans*, *P. aeruginosa*, *B. gladioli*, *P. pickettii*...) et ont noté 57 à 80% d'identifications correctes, le système RapID NF Plus étant le plus performant dans l'identification des BGN non fermentants, et le système Remel étant le performant pour l'identification des espèces du complexe *cepacia*. Les principales erreurs d'identification étaient l'identification en tant que complexe *B. cepacia* d'isolats appartenant en réalité aux espèces *B. gladioli* et *R. pickettii*, et inversement l'identification erronée en tant que *R. pickettii* ou *P. fluorescens* d'isolats du complexe *cepacia*.

- van Pelt et col. (1999) [263] ont noté la faible performance de 4 systèmes commerciaux (Vitek GNI, Vitek NFC, API 20NE, et MicroScan), une meilleure capacité d'identification des espèces du complexe *cepacia* par le système API20NE et une identification erronée de *B.*

gladioli (ne faisant pas partie de la base de données de ces systèmes) plutôt qu'une absence d'identification dans 50 à 100% des cas.

- L'étude de Ferroni et col. (1999) [262], portant sur 1093 isolats de bacilles à Gram négatif non fermentants (702 expectorations provenant de 148 patients), a montré qu'environ 4% (18 % des patients) de ces isolats posaient des problèmes d'identification. La plupart des souches atypiques se sont révélées être des souches de *P. aeruginosa* (colonies de petites tailles et non pigmentées), suivies par *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* et *Burkholderia sp.* Avec la galerie API20 NE, un profil inconnu a été obtenu pour 75 % des isolats atypiques et une identification erronée pour 25 % d'entre eux, ceci malgré les bonnes performances de cette méthode comparées à celles d'autres systèmes commercialisés [263]. L'erreur la plus fréquente était l'identification comme *B. cepacia* de souches de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* ou *A. xylosoxidans*, erreur d'autant plus trompeuse que certains isolats, résistants à la colistine, ont été retrouvés sur le milieu sélectif *cepacia*.

- D'après une étude de Segonds et col. (1999) [261], des problèmes d'identification concernant des isolats du complexe *B. cepacia* ont été notés avec la galerie API20NE, avec notamment des identifications incomplètes dans 28 % des cas (n=51) (*B. cepacia*/ *P. aureofaciens*/ *P. fluorescens*), des erreurs d'identification (2%) (*Aeromonas salmonicida*) en raison de tests d'assimilation négatifs et l'absence d'identification (21%) liée principalement à l'absence de réaction positive au test de l'oxydase.

- Dans une étude impliquant 115 centres de mucoviscidose aux Etats-Unis, portant sur 1051 isolats de bacilles Gram négatif non fermentants [129], 11 % (88/770) des isolats identifiés comme *B. cepacia* n'en étaient pas, mais appartenaient à l'espèce *B. gladioli* (n=28), qui ne fait pas partie de la base des données de la plupart des systèmes, ou aux genres (n=34) *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* ou bien à des espèces appartenant à des taxons non connus (n=26).

Inversement, 36 % (101/281) des isolats, identifiés comme *B. gladioli* (n = 9), *Ralstonia pickettii* (n = 7), *Pseudomonas species* (n = 4), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 2), *Alcaligenes species* (n = 2), Gram négatif non fermentants (n = 20), possible *Burkholderia sp.* (n=29) ou non identifiés (n=28) appartenaient en fait au complexe *B. cepacia* (dont 47 isolats de *B. multivorans*, souvent mal identifiés en raison de l'absence d'oxydation du sucrose et de la variabilité du test lysine décarboxylase). Cette étude [265] a mis en évidence une faible

performance des systèmes d'indentification pour l'identification des espèces du complexe *cepacia* et des autres espèces de BGN non fermentants : les 9 systèmes commerciaux utilisés (108 centres) ont tous été à l'origine d'au moins une identification erronée en tant que *B. cepacia*. La valeur prédictive positive de l'identification d'un isolat en tant que *B. cepacia* pour ces différents systèmes se situait entre 71% et 98% avec pour la plupart d'entre eux, une limite basse de l'intervalle de confiance (95%) avoisinant les 75%. Les systèmes VITEK GNI Plus et Remel N/F présentaient les plus fortes valeurs prédictives, indiquant un fort niveau de confiance pour un test positif pour *B. cepacia*. Les valeurs prédictives négatives était relativement basses (50 à 82%), et, pour la plupart des systèmes, les isolats non identifiés en tant que *B. cepacia* avaient une probabilité de 20% d'appartenir tout de même à ce complexe.

- D'après Moissenet et col. (2005) [266], environ 6 % des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés chez les patients atteints de mucoviscidose ne sont pas identifiés avec suffisamment de précision par les moyens phénotypiques de routine. Dans leur étude, 20/29 isolats étaient correctement identifiés par la galerie ID32GN, et 9/29 isolats (4 *A. xylooxidans*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *Bordetella petrii*, 1 *Bordetella bronchiseptica*, 1 *Cupriavidus respiraculi* et 1 *Ralstonia mannitolilytica*) présentaient des résultats problématiques avec cette galerie. En effet, les taxons obtenus indiquaient au mieux le genre *Pseudomonas* sans précision d'espèce, au pire « profil douteux ou inacceptable ».

- D'après Wellingshausen et col. (2005) [267], la galerie API20NE a permis l'identification correcte de seulement 17% (15/88) des souches de bacilles Gram négatif non fermentants inhabituelles testées. Une bonne concordance entre les résultats de la galerie et du séquençage de l'ARNr16S était observée pour un niveau d' « excellente identification » de la galerie. Les résultats classés en « très bonne » et « bonne » identification montraient un fort taux d'erreur (67 et 84%). L'ensemble des isolats atypiques de *P. aeruginosa* était incorrectement ou non identifié par la galerie. Les principales erreurs d'identification concernaient *Achromobacter xylooxidans* identifié à tort comme *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, ou *Pseudomonas fluorescens*; et *P. aeruginosa* identifié par erreur comme *Comamonas testosteroni* / *P. alcaligenes* complex, *P. fluorescens*, ou *Photobacterium damsela*.

- Une évaluation de deux systèmes d'identification automatisés [268] (BD Phoenix (Becton Dickinson) et VITEK 2 (carte GNB, bioMérieux), pour l'identification d'isolats du complexe *cepacia*, a montré une faible performance de ces systèmes avec des taux d'identifications

correctes de seulement 50 et 53%, respectivement. Plus de la moitié des isolats incorrectement identifiés par ces systèmes ont été identifiés en tant que *Ralstonia pickettii*, *Cupriavidus pauculus*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter* spp. ou, pour le VITEK 2 en tant que « non fermentants ».

L'antibiogramme constitue souvent une aide précieuse à l'identification lorsque l'antibiotype est caractéristique (sensibilité naturelle de *P. aeruginosa* à la colistine ou résistance à la colistine et aux aminosides pour *B. cepacia*, et résistance de *S. maltophilia* à l'imipénème par exemple), (voir figure 15) mais au cours de l'évolution et des traitements antibiotiques répétés, l'antibiogramme devient moins informatif du fait de la multirésistance des isolats.

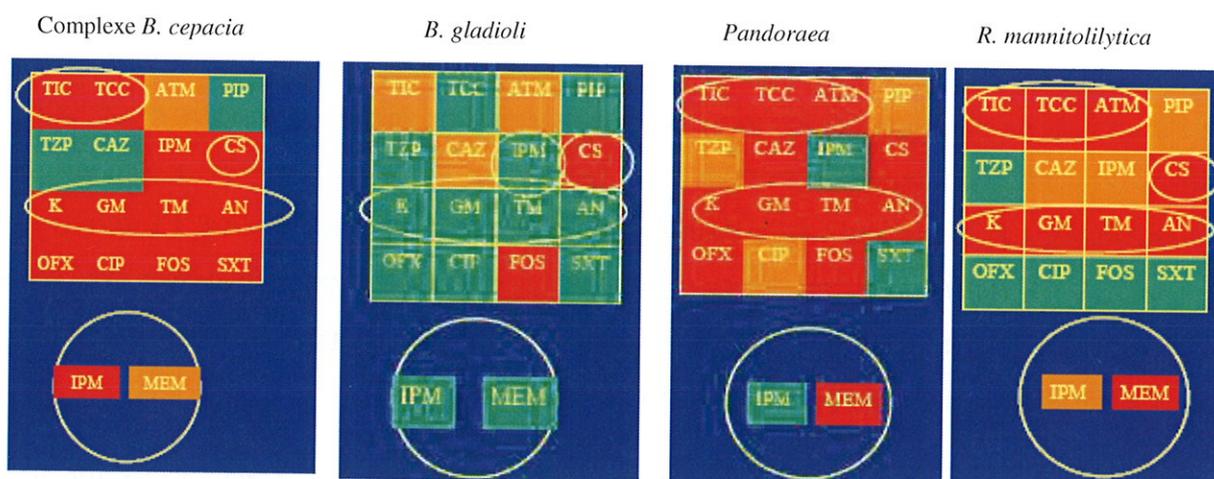


Figure 15 : Susceptibilité aux antibiotiques de certains BGN non fermentants.

Sensible, Intermédiaire, Résistant. TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline-acide clavulanique, PIP : piperacilline, ATM : aztreonam, TZP : piperacilline-tazobactam, CAZ : ceftazidime, CS : colistine, K : kanamycine, GM : gentamicine, TM : tobramycine, AN : amikacine, OFX : ofloxacin, CIP : ciprofloxacine, FOS : fosfomycine, SXT : triméthoprime, IMP : imipénème, MEM : méropénème.

Dans le cadre de la mucoviscidose, l'ensemble des études réalisées sur les performances des systèmes d'identification utilisant des méthodes phénotypiques montre la nécessité de confirmer les résultats de ces méthodes par des méthodes génotypiques. La plupart des méthodes moléculaires sont fondées sur le polymorphisme du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, comme l'analyse du polymorphisme de restriction (RFLP), la technique ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) ou le séquençage partiel. D'autres méthodes existent telles que l'analyse du gène RecA pour les espèces du complexe *cepacia*, du gène

GyrB pour les espèces du genre *Pandoraea*, et différentes techniques d'hybridation *in situ* utilisant la fluorescence (FISH) (*A. xyloxidans*...) ; et plusieurs techniques de PCR spécifique d'espèce ont été développées (SS-PCR), par exemple pour l'identification de *B. gladioli*, et des espèces du genre *Pandoraea* et *Ralstonia*.

**III. EVALUATION DES PERFORMANCES DU
SYSTEME VITEK2 POUR
L'IDENTIFICATION DES GERMES GRAM-
NON FERMENTANTS ISOLES DE
MUCOVISCIDOSE. (VITEK 2 GN – REF 21341)**

1- INTRODUCTION

Dans les laboratoires de routine, l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNNF) repose principalement sur les caractéristiques biochimiques des souches. Des systèmes automatisés d'identification (VITEK (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MicroScan (Dade, West Sacramento, Calif.), et PHOENIX (BD, Sparks, Md.)), qui comportent des logiciels permettant d'identifier les phénotypes des microorganismes, sont largement utilisés par les laboratoires de microbiologie. Ces systèmes permettent de tester un nombre important de caractères biochimiques, et sont caractérisés par une obtention rapide des résultats permettant de faire face à un volume important de tests avec des ressources et un personnel souvent limités.

Comme nous l'avons vu précédemment, les souches de BGNNF isolées de mucoviscidose peuvent présenter des caractéristiques phénotypiques particulières (aspect des cultures) et certains caractères biochimiques utilisés pour l'identification peuvent s'avérer déficients. Les performances de divers systèmes commerciaux, automatisés ou non, (API20NE, carte VITEK GNB, GNI...) pour l'identification des BGNNF issus de patients mucoviscidosiques ont été évaluées et se sont montrées insuffisantes [261-268].

La carte d'identification colorimétrique VITEK 2 GN (Ref 21341), disponible sur le marché du diagnostic depuis 2004, permet l'identification des Bacilles à Gram négatif, fermentants et non fermentants les plus fréquemment isolés en clinique. Cette carte a été conçue dans le but d'élargir le nombre d'espèces identifiables par le système VITEK2 et d'obtenir un meilleur rendement d'identification. Elle comporte 47 tests et la base de données correspondante compte 159 taxons comparés à, 41 et 101, respectivement, pour la précédente carte d'identification fluorométrique (GNB). Des mesures sont réalisées toutes les 15 minutes et le temps d'incubation peut s'élever jusqu'à 10 heures (3 heures pour la carte GNB).

Le but de cette étude est d'établir les performances de la carte VITEK 2 GN, utilisée en routine dans notre laboratoire (Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Institut fédératif de Biologie, Hôpital Purpan, Toulouse, France) pour l'identification des bactéries à Gram négatif non fermentants, isolés de prélèvements de patients atteints de mucoviscidose. Les résultats d'identification obtenus avec cette carte seront comparés à ceux obtenus avec les techniques

moléculaires utilisées au laboratoire : méthode PCR exotoxine A pour *Pseudomonas aeruginosa*, méthode ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) développée par le laboratoire pour les autres espèces.

2- MATERIEL ET METHODES

2.1. Souches bactériennes

Au total, 134 souches ont été étudiées, réparties en 105 souches obtenues dès leur isolement au laboratoire et 29 souches appartenant à des espèces rarement isolées, provenant de la collection du laboratoire.

Les 105 souches "issues de la routine" du laboratoire ont été recueillies prospectivement à partir d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose sur une période de 5 mois (fin août 2006 à fin janvier 2007). Ces expectorations ont été traitées selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie. L'éventuel caractère mucoïde des souches a été noté.

Vingt-neuf souches de la collection du laboratoire (Observatoire National *Burkholderia cepacia*/Vaincre la mucoviscidose) comprenant 10 souches de *Ralstonia mannitolilytica*, 15 souches du complexe *B. cepacia* (4 souches de *B. multivorans*, 4 souches de *B. cenocepacia*, 1 souche de *B. cepacia*, 2 souches de *B. stabilis*, 1 souche de *B. dolosa*, 3 souches de *B. vietnamiensis*), 3 souches d'*Achromobacter xylosoxidans* et 1 souche de *Pandoraea sp.*, ont été testées durant cette étude, de façon à apporter un supplément d'information sur l'identification de quelques espèces rarement isolées de mucoviscidose. Ces souches conservées congelées à -20°C ont été repiquées sur gélose Columbia au sang avant identification phénotypique et moléculaire.

2.2. Identification des souches par la carte colorimétrique VITEK2 GN

La carte VITEK 2 GN a été utilisée selon les recommandations du fabricant.

Les souches isolées sur milieu sélectif non recommandé par le fabricant ou ayant plus de 24 heures ont fait l'objet d'un repiquage sur Gélose Columbia 5% sang de mouton (bioMérieux) avant ensemencement des cartes. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées sur milieu cétrimide (OXOID) ont servi à l'ensemencement direct des cartes dans le cas de cultures pures ou ont été repiquées sur Gélose Columbia 5% sang de mouton en cas de mélange.

Après une incubation de 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, une suspension bactérienne dans une solution de chlorure de sodium à 0,45% a été ajustée à un standard Mac Farland situé entre 0,58 et 0,62, à l'aide de l'appareil Densichek VITEK2 (bioMérieux). Ces suspensions et les cartes GN ont été introduites dans une cassette qui a alors été placée dans le VITEK 2. Le délai entre la préparation des solutions et l'introduction de la cassette dans l'appareil était inférieur à 30 minutes.

La carte VITEK 2 GN comporte 47 tests colorimétriques mesurant l'utilisation de sources de carbone, diverses activités enzymatiques et la résistance à diverses substances inhibitrices. Les résultats de ces tests sont lus de façon automatique toutes les 15 minutes grâce à un système de lecture optique, le temps d'incubation maximal étant de 10 heures. Les données sont comparées à celles de la base de données VITEK 2 (version 4.01) permettant l'identification bactérienne selon un mode cinétique à partir de 2 heures d'incubation.

Contrôles de qualité :

Au cours de l'étude, l'identification correcte de souches de contrôles de qualité (une souche de *Klebsiella Oxytoca* et une souche d'*Enterobacter cloacae* fournies par bioMérieux) a été vérifiée à intervalles réguliers.

Recueil des résultats :

Les identifications fournies par la carte GN ont été comparées à celles obtenues par les méthodes moléculaires et ont été classées en quatre catégories :

- Identification concordante avec le résultat de la méthode moléculaire (identification au niveau de l'espèce sans ambiguïté) : cette catégorie est subdivisée en quatre groupes en fonction de la probabilité de l'exactitude de l'identification (excellente identification : probabilité supérieure à 96%, très bonne identification : probabilité entre 93 et 95%, bonne identification : probabilité entre 89 et 92% et identification acceptable : probabilité entre 85 et 88%)
- Identification avec un faible niveau de discrimination (plusieurs espèces proposées par l'appareil incluant l'identification correcte)
- Identification erronée (l'identification fournie par la carte GN diffère de celle donnée par la méthode de référence)
- Pas d'identification.

2.3. Identification des souches par les méthodes moléculaires (méthodes servant de référence)

Deux types de méthodes moléculaires ont été utilisés au cours de cette étude. La première technique consiste à amplifier par PCR le gène de l'exotoxine A, spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* [269,270]. La seconde technique (ARDRA) permet d'identifier les bacilles à Gram négatif aérobies stricts et repose sur une première étape d'amplification de l'ADNr 16S suivie d'une seconde étape de restriction enzymatique, par plusieurs enzymes, des amplicons d'ADNr16s, la somme des profils de restriction constituant le génotype 16 S [271,272].

Ces deux techniques sont précédées d'une étape d'extraction de l'ADN bactérien par lyse thermique. Les étapes de ces deux techniques sont résumées brièvement ci –dessous.

- Identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* par la mise en évidence du gène de l'exotoxine A par PCR

Les amorces ETA1 (5'-GAC CAA CGC CCT CAG CAT CAC CAGC-3') et ETA2 (5'-GCG CTG GAG CGA ATG GGC CAG CGG CAA GG-3') sont utilisées pour amplifier (30 cycles d'amplification) une région de 396 pb comprise dans le gène de structure de l'exotoxine A. Un témoin négatif où l'eau remplace l'échantillon d'ADN et un témoin positif

sont inclus dans chaque série. Le résultat de la PCR est visualisé par la réalisation d'une électrophorèse en gel d'agarose : les souches de *P. aeruginosa* étant caractérisées par une bande spécifique de 396 pb (voir figure 16).

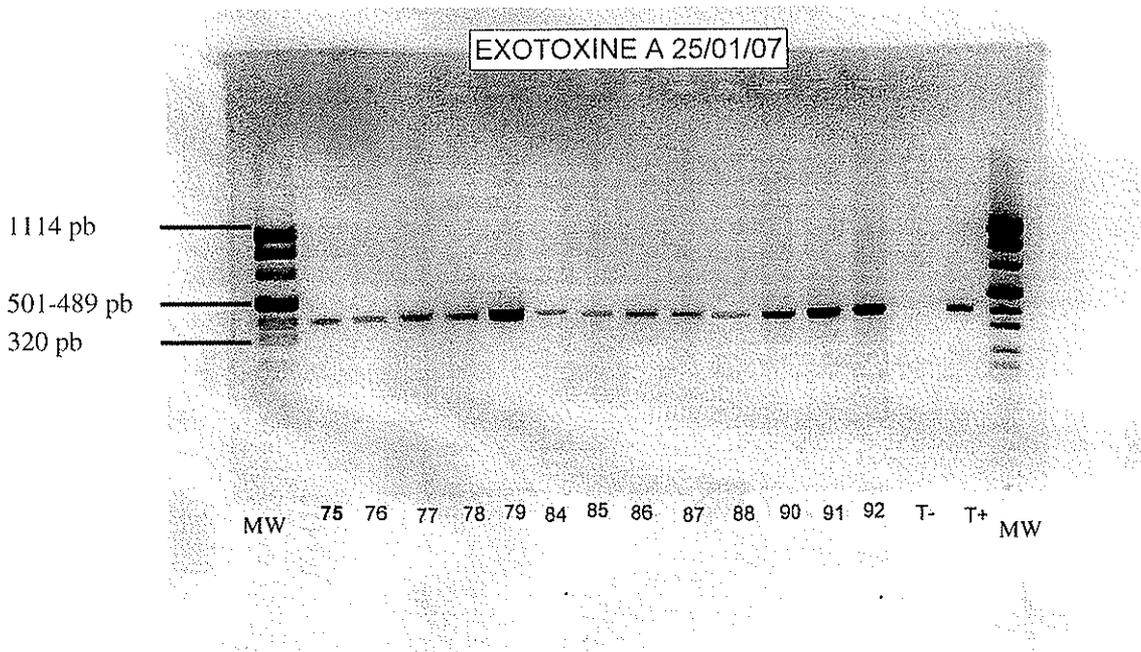


Figure 16 : Résultats de PCR Exotoxine A obtenus avec 13 souches de *P. aeruginosa*.
MW : marqueur de taille (marqueur VIII), T- : témoin négatif, T+ : témoin positif

- Méthode ARDRA

La méthode ARDRA a été réalisée selon un protocole précédemment décrit [272]. Elle comporte une première étape d'amplification suivie d'une étape de digestion du produit PCR. Brièvement, les amorces fD1 (5'- CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3') et rD1 (5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') sont utilisées pour amplifier (30 cycles d'amplification) une région d'approximativement 1500 pb à l'intérieur du gène de l'ARNr 16S. Un témoin négatif où l'eau remplace l'échantillon d'ADN est inclus dans chaque série. Une électrophorèse en gel d'agarose permet de visualiser le résultat de cette PCR (bande de 1500 pb). Les amplicons d'ADNr 16S sont alors digérés par cinq enzymes de restriction : *AluI*, *HhaI*, *DdeI*, *MspI*, *XmnI*, les mélanges amplicon/ endonucléase étant incubés pendant une heure au bain-marie à 37°C. Le résultat de cette digestion est visualisé après électrophorèse en gel d'agarose. Le profil obtenu avec chaque enzyme est comparé aux profils de référence, c'est-à-dire obtenus avec la souche type

de l'espèce, la somme des profils obtenus avec les cinq enzymes constituant le génotype ADNr 16S caractéristique d'une espèce donnée (voir figure 17).

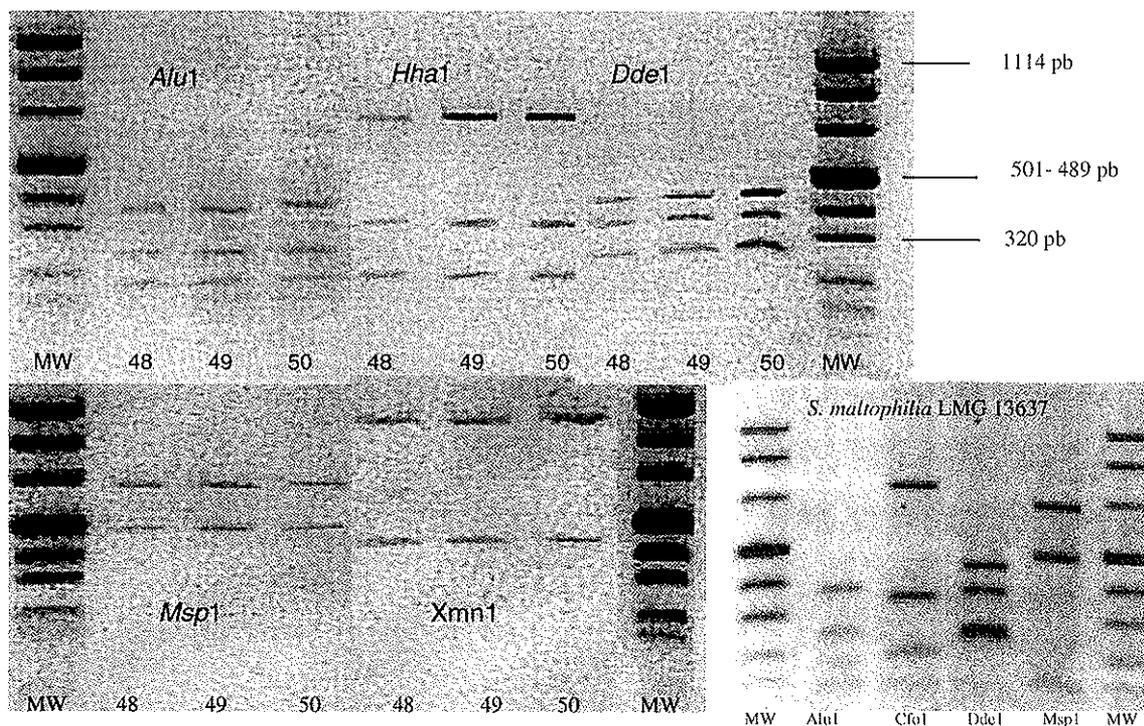


Figure 17 : Profils ARDRA de trois souches de *S. maltophilia* (souches 48, 49 50) et de la souche de référence LMG 13637. MW : marqueur de taille (marqueur VIII).

3- RESULTATS

Les 105 souches recueillies prospectivement au laboratoire à partir d'expectorations (n=68) proviennent de 55 patients mucoviscidosiques, âgés de 1 à 45 ans avec un âge moyen de 20 ans et un âge médian de 17 ans. Un à quatre germes ont été étudiés par expectorations, appartenant à des espèces différentes ou à la même espèce, dans ce dernier cas les souches présentaient des morphotypes et des antibiotypes différents. Ces souches se répartissent de la façon suivante : *Pseudomonas aeruginosa* (78 souches dont 38 souches muqueuses), *Stenotrophomonas maltophilia* (12 dont une muqueuse), *Achromobacter xylooxidans* (7), *Burkholderia cenocepacia* (2), *Burkholderia multivorans* (2), *Burkholderia pyrrocinia* (2), *Pandora sp.* (2). Vingt-neuf souches de la collection du laboratoire (Observatoire National *Burkholderia cepacia*/Vaincre la mucoviscidose) ont été ajoutées. Ainsi, un total de 134 souches a fait l'objet de cette étude (tableau 6).

Genre ou espèce	Nombre de souches
<i>P. aeruginosa</i>	78 (35 muqueuses)
<i>S. maltophilia</i>	12 (1 muqueuse)
Complexe <i>B. cepacia</i>	21
<i>B. cenocepacia</i>	6
<i>B. multivorans</i>	6
<i>B. cepacia</i>	1
<i>B. stabilis</i>	2
<i>B. vietnamensis</i>	3
<i>B. dolosa</i>	1
<i>B. pyrrocinia</i>	2
<i>A. xylosoxidans</i>	10
<i>R. mannitolilytica</i>	10
<i>Pandoraea</i>	3
Total	134

Tableau 6 : Souches étudiées.

Au cours de cette étude, trois souches (une souche de *S. maltophilia*, une souche de *B. multivorans*, et une souche de *B. vietnamiensis*) non identifiées lors d'un premier passage au VITEK ont fait l'objet d'un nouveau test : les deux souches appartenant au complexe *B.cepacia* ont alors été identifiées ; la souche de *S. maltophilia* a été identifiée par le VITEK2 comme étant *Sphingomonas paucimobilis* après 24h d'incubation, cependant un troisième passage après 48h d'incubation a permis d'obtenir une identification correcte, non prise en compte dans le tableau ci-après, dans la mesure où il ne s'agit pas des conditions habituelles d'analyse.

Parmi les 134 souches appartenant à 12 taxons différents, 114 (85,1%) ont été correctement identifiées, 7 (5,2%) identifiées avec une faible discrimination, nécessitant des tests additionnels pour l'identification définitive et 13 (9,7%) ont été incorrectement identifiées (tableau 7).

Souches testées n =134 (toutes espèces)	Identification Concordante	Identification avec un faible niveau de discrimination	Identification erronée	Absence d'identification
Nombre (%) Premier test	112 (83,6%)	7 (5,2%)	12 (8,96%)	3 (2,2%)
Nombre (%) Après repassage des 3 souches non identifiées	114 (85,1%)	7 (5,2%)	13 (9,7%)	0

Tableau 7 : Evaluation des performances de la carte d'identification VITEK 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence sur 134 souches issues de patients mucoviscidosiques. Dans ce tableau figurent les résultats d'identification obtenus avec la carte Vitek 2 GN avant et après le deuxième passage des souches initialement non identifiées.

Parmi les 134 souches testées, 3 appartiennent au genre *Pandoraea*, non revendiqué par la carte VITEK 2 GN. De même, les espèces *Burkholderia dolosa* (description en 2004) et *Burkholderia pyroccinia* (1965 -2002-2004) n'ont pas été testées durant la construction de la base de connaissance du VITEK 2. Après retrait de ces 6 souches non revendiquées par la carte, le pourcentage d'identifications concordantes s'élève à 87,5%, le taux d'identifications avec une faible discrimination à 5,5% et celui d'identifications erronées à 7% (tableau 8).

Souches testées n = 128 (espèces revendiquées par le Vitek 2)	Identification concordante	Identification avec un faible niveau de discrimination	Identification erronée
Nombre (%)	112 (87,5%)	7 (5,5%)	9 (7,0%)

Tableau 8 : Evaluation des performances de la carte d'identification VITEK 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence sur 128 souches issues de patients mucoviscidosiques et appartenant à des espèces revendiquées par le VITEK 2.

Les performances de la carte VITEK 2 GN pour l'identification des différents taxons pris individuellement figurent dans le tableau 9.

- Les résultats donnés dans ce tableau incluent le deuxième passage sur le VITEK 2, évoqué plus haut, pour les trois souches préalablement non identifiées.
- Les souches appartenant au complexe *cepacia* correctement identifiées, ont été reconnues comme appartenant au « *Burkholderia cepacia* group », la carte GN ne permettant pas d'identification au niveau de l'espèce pour les espèces de ce complexe.
- Sur les dix souches d'*A. xylooxidans* testées, sept souches, dont l'identification a été jugée correcte, ont été assimilées à la sous espèce *A. xylooxidans subsp. xylooxidans* (n=6) et une souche a été identifiée avec une faible discrimination entre les deux sous-espèces (*A. xylooxidans subsp. xylooxidans* et *A. xylooxidans subsp. denitrificans*.)
- Aucune des 3 souches de *Pandoraea sp.*, dont le genre n'est pas revendiqué par la carte, n'a été identifiée. Par contre, parmi les 3 souches de *B. dolosa* (1) et *B. pyrrocinia* (2) appartenant à des espèces non revendiquées par la carte, 2 sur 3 ont été correctement identifiées au taxon *Burkholderia cepacia* group.
- Les résultats d'identification des souches non muqueuses et muqueuses de *P. aeruginosa* ont été répertoriés dans ce tableau. Contrairement à ce que l'on pouvait penser, les souches muqueuses n'ont pas posé plus de problème d'identification que les souches non muqueuses.

Espèces	Nombre de souches	Identification Concordante	Identification avec un faible niveau de discrimination	Identification erronée
<i>P. aeruginosa</i>	78	70 (89,7%)	4 (5,15 %)	4 (5,15%)
- Souches non muqueuses	43	37 (86,05%)	4 (9,3%)	2 (4,65%)
- Souches muqueuses	35	33 (94,28%)	0	2 (5,7%)
<i>S. maltophilia</i>	12	10 (83,3%)	0	2 (16,7%)
<i>A. xylooxidans</i>	10	7 (70%)	3 (30%)	0
<i>R. mannitolilytica</i>	10	8 (80%)	0	2 (20%)
<i>Burkholderia cepacia</i> grpe	21	19 (90,5%)	0	2 (9,5%)
<i>B. multivorans</i>	6	5 (83,3%)	0	1 (16,7%)
<i>B. cenocepacia</i>	6	6 (100%)	0	0
<i>B. cepacia</i>	1	1 (100%)	0	0
<i>B. stabilis</i>	2	2 (100%)	0	0
<i>B. vietnamiensis</i>	3	3 (100%)	0	0
<i>B. dolosa</i>	1	1 (100%)	0	0
<i>B. pyrrocinia</i>	2	1 (50%)	0	1 (50%)
<i>Pandoraea</i>	3	0	0	3 (100%)
Total	134	114	7	13

Tableau 9 : Evaluations des performances de la carte Vitek 2 GN par comparaison avec la méthode moléculaire de référence, en fonction de l'espèce ou du genre.

Le tableau suivant (tableau 10) répertorie les identifications concordantes données par la carte GN en fonction de l'espèce ou du genre et de la probabilité de l'exactitude de l'identification (identification excellente : probabilité supérieure à 95%, très bonne identification : probabilité entre 93 et 95%, bonne identification : probabilité entre 89 et 92% et identification acceptable : probabilité entre 85 et 88%). La majorité des souches (environ 79%) correctement identifiées par la carte VITEK 2 GN l'ont été avec la mention « identification excellente ».

Espèces	Identification excellente	Très bonne identification	Bonne identification	Identification acceptable	Total
<i>P. aeruginosa</i>	63	7			70
Souches non muqueuses	34	3			37
Souches muqueuses	29	4			33
<i>S. maltophilia</i>	6	3		1*	10
<i>A. xylooxidans</i>	4	2			6
<i>R. mannitolilytica</i>	3	4		1	8
Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	13	4	1	1	19
<i>B. multivorans</i>	3	1	1		5
<i>B. cenocepacia</i>	3	3			6
<i>B. cepacia</i>	1				1
<i>B. stabilis</i>	2				2
<i>B. vietnamiensis</i>	3				3
<i>B. dolosa</i>				1	1
<i>B. pyrrocinia</i>	1				1
Total	89 (78,75 %)	20(17,70 %)	1 (0,9 %)	3 (2,65 %)	113

Tableau 10 : Résultats des identifications concordantes avec les méthodes de référence, données par la carte VITEK 2 GN, en fonction de l'espèce ou du genre et de la probabilité de l'exactitude de l'identification. *souche mucoïde de *S. maltophilia*.

Le détail des identifications réalisées avec une faible discrimination et des erreurs d'identification fournies par la carte GN figurent dans le tableau 11.

Méthode moléculaire de référence
(nombre de souches)

Résultat de la carte VITEK 2 GN

Souches identifiées avec une faible discrimination (8)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> [50,27]/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [49,73]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [50,26-50,54]/ <i>Pseudomonas fluorescens</i> [49,74-49,46]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [50,25]/ <i>Pseudomonas putida</i> [49,75]
<i>A. xylosoxidans</i> (1) *	<i>A. xylosoxidans ssp denitrificans</i> [50,26] / <i>A. xylosoxidans ssp xylosoxidans</i> [49,74]**
<i>A. xylosoxidans</i> (3)*	<i>A. xylosoxidans ssp xylosoxidans</i> [33,57] / <i>A. xylosoxidans ssp denitrificans</i> [33,21] / <i>Comamonas testosteroni</i> [33,21]

Identifications erronées données par la carte VITEK 2 GN (13)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EI-TBI)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> [50,52]/ <i>Pseudomonas fluorescens</i> [49,48]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> [50] / <i>Ralstonia paucula</i> [50]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (EI)
<i>Stenotrophomonas. maltophilia</i> (1)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (TBI)
<i>Pandoraea</i> (1)	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (EI)
<i>Pandoraea</i> (1)	<i>Ralstonia paucula</i> (TBI)
<i>Pandoraea</i> (1)	<i>P. fluorescens</i> [33,85]/ <i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis</i> [33,08]/ <i>A.xylosoxidans ssp denitrificans</i> [33,08]
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (1)	<i>Ralstonia pickettii</i> (BI)
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (1)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (TBI)
<i>Burkholderia multivorans</i> (1)	<i>Moraxella group</i> [50,53]/ <i>Acinetobacter lwoffii</i> [49,47]
<i>Burkholderia pyrocinia</i> (1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EI)

*A noter que les sous-espèces *A. xylosoxidans ssp denitrificans* et *A. xylosoxidans ssp xylosoxidans* ne peuvent être différenciées par la technique ARDRA.

** Cette souche a été considérée comme étant correctement identifiée.

EI : excellente identification, TBI : très bonne identification, BI : bonne identification

Les chiffres entre crochets correspondent à la probabilité de l'exactitude de l'identification, donnée en pourcentage.

Tableau 11 : Liste des erreurs d'identification et des faibles discriminations données par la carte VITEK 2 GN.

Les 8 souches identifiées avec une faible discrimination (plusieurs possibilités d'identification) concernent 4 souches de *P. aeruginosa* non muqueuses et quatre souches d'*A. xylooxidans*. Le test biochimique complémentaire conseillé par le VITEK 2 pour différencier *P. aeruginosa* des espèces *P. putida* et *fluorescens* consiste à rechercher la pyocyanine, pigment caractéristique de *P. aeruginosa* et absent chez les deux autres espèces. Cependant, ce pigment peut être absent des souches de patients mucoviscidosiques.

Pour trois souches appartenant à l'espèce *A. xylooxidans*, trois possibilités d'identification ont été fournies : les deux sous espèces d'*A. xylooxidans* et l'espèce *Comamonas testosteroni*. Toujours d'après le VITEK 2, la différenciation d'*A. xylooxidans* ssp. *xylooxidans* et *denitrificans* peut être effectuée en testant l'assimilation du d-Glucose positive pour la sous espèce *xylooxidans*. Les bactéries du genre *Comamonas* sont des bacilles à Gram négatif, oxydase positive, ne fermentant pas le glucose, appartenant à la classe des bêta-protéobactéries ; ce sont des bactéries ubiquistes, peu isolées en clinique (bactériémies, conjonctivites). Le VITEK 2 ne préconise aucun test pour différencier cette espèce d'*A. xylooxidans*. Contrairement aux souches d'*A. xylooxidans*, la plupart des souches de *Comamonas testosteroni* n'assimile pas le citrate et l'acide phénylacétique (ces tests font partie des tests présents dans la galerie API20NE).

Les erreurs d'identifications (n=13) concernent 4 souches de *P. aeruginosa*, 2 souches de *S. maltophilia*, 2 souches de *R. mannitolilytica*, une souche de *B. multivorans*, ainsi qu'une souche de *B. pyrrocinia* et l'ensemble des trois souches de *Pandoraea* sp. testées, ces deux dernières espèces ne faisant pas partie de la base de données du VITEK 2. Pour 9 souches incorrectement identifiées, le VITEK 2 a fourni une identification (un seul choix) avec une probabilité d'exactitude excellente (n=4), très bonne (n=4), et bonne (n=1), pour les quatre autres souches, l'identification était réalisée avec une faible discrimination (plusieurs choix).

Les durées nécessaires à l'obtention d'une identification en fonction des espèces figurent dans le tableau ci-dessous (tableau 12). Au cours de cette étude, la durée moyenne d'obtention des résultats est de 6.1 heures. La durée d'incubation moyenne obtenue avec les trois souches de *Pandoraea sp.* est la plus importante, ce qui s'explique par le fait que ce genre ne fait pas partie de la base de données du VITEK 2.

Espèce ou genre	Durée nécessaire à l'identification
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,8
- Souches non muqueuses	5,9
- Souches muqueuses	5,7
<i>S. maltophilia</i>	5,2
<i>A. xylooxidans</i>	7,65
<i>R. mannitolilytica</i>	7,28
Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	5,5
<i>B. multivorans</i>	5,8
<i>B. cenocepacia</i>	5,2
<i>B. cepacia</i>	5
<i>B. stabilis</i>	4,875
<i>B. vietnamiensis</i>	5,8
<i>B. dolosa</i>	5
<i>B. pyrrocinia</i>	6,25
<i>Pandoraea sp.</i>	8,8
Moyenne générale	6,09

Tableau 12 : Durée (en heures) nécessaire à l'obtention de l'identification par la carte GN, en fonction de l'espèce ou du genre.

Enfin, l'analyse, réalisée par bioMérieux, des profils biochimiques des souches de *P. aeruginosa* fournis par la carte GN, n'a pas révélé de variation du pool enzymatique des isolats présentant un morphotype différent (mucoïde et non mucoïde).

4- DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de cette étude prospective, nous avons examiné l'aptitude de la carte d'identification colorimétrique VITEK 2 GN à identifier les bacilles à Gram négatif non fermentants issus de patients atteints de mucoviscidose.

Il s'agit donc d'une étude spécifique concernant les souches bactériennes rencontrées dans la mucoviscidose, pour lesquelles le microbiologiste est fréquemment confronté à des problèmes d'identification lié au temps de pousse souvent plus long, à la présence d'atypies morphologiques (caractère mucoïde), et biochimiques (absence de caractères utilisés pour l'identification).

Nous avons ciblé cette étude sur les espèces d'importance clinique retrouvées dans cette pathologie, certaines d'entre elles ayant déjà fait l'objet d'études de performances de la carte VITEK 2 GN en dehors d'un terrain mucoviscidosique.

Si l'on considère uniquement les souches appartenant à des taxons pris en compte dans la base de données du VITEK 2, 87,5% des souches ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce, ou du complexe en ce qui concerne les espèces appartenant au complexe *B. cepacia* ; 5,5 % avec un faible niveau de discrimination et 7% incorrectement identifiées.

En cas de faible discrimination, la mise œuvre de tests supplémentaires simples (recherche de pyocyanine, assimilation du D-glucose) est préconisée par le VITEK 2. Cependant, dans le cadre de la mucoviscidose, la recherche de ces caractères peut s'avérer infructueuse dans la mesure où certaines souches bactériennes sont parfois déficientes et ne peut donc permettre une identification définitive des souches.

Les résultats de diverses études de performances avec les cartes d'identification VITEK GNI, GNI+ et GNB, qui ont précédé la carte GN figurent dans le tableau 13 (études non spécifiques des souches de mucoviscidose) et dans le tableau 14 (études incluant des souches issues de mucoviscidose).

Les résultats de performances de la carte colorimétrique GN obtenus au cours de diverses études, toutes réalisées en dehors du cadre de la mucoviscidose, figurent dans le tableau 15.

Etude	Robinson et col. 1995 [273]	Bourbeau et col. 1998 [274]	Bourbeau et col. 1998 [274]	Sung et col. 2000 [275]	Funke et col. 1998 [276]	Jossart et Courcol 1999 [277]	Ling et col. 2001 [278]	Joyanes et col. 2001 [279]	Gavin et col. 2002 [280]	O'Hara et Miller 2003 [281]	Bosshard et col. 2006* [282]
Carte testée	GNI	GNI	GNI+	GNI+	ID-GNB	ID-GNB	ID-GNB	ID-GNB	ID-GNB	ID-GNB	ID-GNB
Méthode de référence	Crystal E/NF, API 20E, Vitek GNI	Rapid ID NF + system	Rapid ID NF + system	Tests biochimiques conventionnels	API50CHE API20NE ID32GN Biotype 100	ID32GN et tests biochimiques conventionnels	API20E	API20NE Tests biochimiques conventionnels (<i>A. baumannii</i>)	Tests biochimiques conventionnels	Tests biochimiques conventionnels	Séquençage du gène de l'ARNr16S
Nombre de souches de BGNF	128	61	61	301	148	116	93	198	169	72	82
Nombre de taxons testés	10	9	9	25	17	18	15	3	6	20	23
Origine des souches (routine ou collection labo)/	Routine + collection	Routine	Routine	Routine	Routine + collection	Routine (92)+ Collection	Collection	Routine	Routine	Collection	Routine
Origine du prélèvement	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Hémocultures (pour <i>A. baumannii</i>) Non précisée	Non précisée	Non précisée	Hémocultures et autres
Identification concordante	95,3 %	82 %	88,5 %	71,8 %	73 %	63,8 %	91,4 %	66,7 %	90,5 %	83,3 %	51,2 %
Identification avec une faible discrimination	2,35 %	16,4 %	8,2 %	20,6 %	4,7 %	32,75 %	-	24,2 %	4,75 %	11,1 %	2,4 %
BGNF	-	-	-	-	20,9 %	-	-	-	2,95 %	-	7,35 %
Identification erronée	0 %	0 %	3,3 %	5,3 %	0,7 %	3,45 %	4,3 %	0,5 %	0,6 %	2,8 %	7,35 %
Absence d'identification	2,35 %	1,6 %	0 %	2,3 %	0,7 %	0 %	4,3 %	8,6	1,2 %	2,8 %	31,7 %

Tableau 13 : Evaluation des performances des cartes GNI, GNI+, et GNB pour l'identification des BGNF. * Seuls les résultats de la carte GNB correspondant à des bactéries identifiées au niveau de l'espèce par séquençage de l'ARNr16S ont été intégrés dans ce tableau.

	Kiska et col. 1996 [264]	Van Pelt et col. 1999 [263]	Brisse et col. 2002 [268]
Carte testée	GNI	GNI	GNB
Méthode de référence	Tests biochimiques conventionnels	PCR – RFLP	Méthodes moléculaires (RFLP, AFLP, ribotypage...)
Origine des souches	Routine (109) + collection (41)	Routine	Routine
Origine clinique	Prélèvements respiratoires mucoviscidose	Prélèvements respiratoires mucoviscidose	Prélèvements respiratoires (64 patients dont 60 mucoviscidosiques)
Nombre de souches testées	150	25	104
Nombre de taxons testés	12 (58 BCC)	2 (20 BCC+5 PA)	3 (85 BCC, 6 <i>R. pickettii</i> , 13 <i>B. gladioli</i>)
Identification correcte	56%	40 %	50 %
Identification avec une faible discrimination	14.7 %	28 %	17.3 %
Identification erronée	17.3%	12 %	23.1 %
Absence d'identification	12 %	20 %	9.6 %

Tableau 14 : Evaluation des performances des cartes VITEK GNI et VITEK 2 GNB pour l'identification de certaines espèces de BGNNF isolées de patients mucoviscidosiques.

BCC : *B. cepacia complex*

	Funke et col. 2004 [283]	Wallet et col. 2005 [284]	Renaud et col. 2005 [285]	Zbinden et col. 2007 [286]****	Notre étude 2007		
Méthode de référence	ID32GN, API20NE, VITEK 1 GNI**	VITEK 2 GNB***	API20NE+ ID32GN**	Séquençage partiel du gène de l'ARNr16S	Techniques moléculaires (exoA et ARDRA)		
Origine des souches	Routine (20) + collection du laboratoire (124)	Routine + collection du laboratoire	Routine + collection du laboratoire	Routine (congélation)	Routine (105) + collection du laboratoire (29)		
Origine clinique	Prélèvements divers (urines, respiratoires, plaies...)	Non précisée	Non précisée	Hémocultures +autres prélèvements	Expectorations de patients mucoviscidiques		
Nombre de taxons testés	12	26	19	21 dont 10 ne font pas partie de la base de données	12 dont 3 ne font pas partie de la base de données		
Nombre de souches testées	144	88	95	70	50*	134	128*
Identification correcte	92.4%	84,1%	93.7%	64.3 %	78%*	85.1 %	87,5%*
Identification avec une faible discrimination	6.2%	8 %	6.3%	1.4%	2%*	5.2 %	5.5%*
Identification erronée	1.4%	6,8 %	0 %	31.4 %	16%*	9.7%	7%*
Absence d'identification	0%	1,1 %	0%	2.9 %	4%*	0%	0%*
Durée moyenne nécessaire à l'identification (en heures)	6,5 (calculé à partir des données de l'article)	6,7	6,1	ND		6,1	

Tableau 15: Comparaison des résultats d'évaluation des performances de la carte VITEK 2 GN de cette étude avec les études précédemment réalisées.

(* chiffres et pourcentages concernant uniquement les espèces revendiquées par la carte VITEK 2 GN**utilisation des galeries biotype 100 et API50CHE ou du séquençage de l'ARNr16S en cas de résultats discordants entre ces méthodes et le résultat de la carte VITEK2GN.***utilisation des galeries ID32GN et API20NE en cas de discordance entre les cartes GNB et GN et si nécessaire séquençage du gène de l'ARNr16S**** Seuls les résultats de la carte GN correspondant à des bactéries identifiées au niveau de l'espèce par séquençage de l'ARNr16S ont été intégrés dans ce tableau. ND : Non déterminée)

Globalement, l'identification des BGNNF est améliorée par l'utilisation de la carte GN (64,3 à 93,7 % d'identifications correctes contre 51,2 à 95,3% avec les cartes précédentes) et la carte GN procure un plus grand nombre d'identifications correctes (85 %) que les cartes précédentes (40 à 56 %) si l'on considère l'identification des BGNNF issus de mucoviscidose (tableau 14). L'utilisation de cette nouvelle carte d'identification a permis une diminution importante des taux d'absence d'identification, ce qui est lié à l'augmentation du nombre d'espèces revendiquées par la carte GN.

Les résultats de notre étude sont en général concordants avec ceux des études précédentes sur la carte GN, réalisées en dehors du cadre de la mucoviscidose. Les souches de notre étude, qui proviennent toutes de patients mucoviscidosiques, n'ont donc pas posé davantage de problème d'identification que les souches incluses dans les études précédentes, provenant de patients présentant diverses pathologies. Ainsi, au cours de cette étude, les résultats obtenus avec la carte GN (87,5 % d'identifications correctes) sont comparables à ceux des études de Funke et col. (92,4 %), Wallet et col. (84,1 %) et Renaud et col. (93,7 %), au cours desquelles seules des espèces revendiquées par la carte GN ont été testées. Dans l'étude de Zbinden et col., même si l'on considère uniquement les espèces revendiquées par la carte GN, un taux d'identification correcte plus faible a été mis en évidence. Ceci peut s'expliquer par le fait que : 1) l'ensemble des souches testées correspondant aux souches congelées de l'étude de Bosshard et col. (2006), et « issues de la routine », n'ont été repiquées qu'une seule fois avant d'être testées sur le VITEK 2, 2) et par un biais de sélection des souches, dans la mesure où seules des souches de *Pseudomonas aeruginosa* atypiques ont été testées.

La durée moyenne d'identification des souches de BGNNF ainsi que les résultats obtenus pour les souches de *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*, du complexe *Burkholderia cepacia*, et *R. mannitolilytica*, étudiés de façon individuelle, sont également comparables aux autres études (tableau 16).

	Funke et al. 2004 [283]	Wallet et col. 2005 [284]	Renaud et al. 2005 [285]	Zbinden et col. 2007 [286]	Notre étude 2007
Nombre de souches de <i>P. aeruginosa</i>	40	13	28	6	78
Identification correcte	37 (92.5%)	13 (100 %)	28 (100%)	5 (83.3 %)	70 (89.7%)
Identification avec une faible discrimination	3 (7.5%)	0	0	0	4 (5.15%)
Identification erronée	0	0	0	1 (16.7 %)	4 (5.15%)
Absence d'identification	0	0	0	0	0
Nombre de souches de <i>A. xylooxidans</i>		8	5	9	10
Identification correcte		6 (75 %)	4 (80 %)	6 (66.7 %)	7 (70%)
Identification avec une faible discrimination		2 (25%)	1 (20 %)	0	3 (30%)
Identification erronée		0	0	2 (22.2 %)	0
Absence d'identification		0	0	1 (11.1 %)	0
Nombre de souches de <i>S. maltophilia</i>	23	9	17	14	12
Identification correcte	23(100%)	8 (88,9 %)	17 (100%)	11 (78.6 %)	10 (83.3%)
Identification avec une faible discrimination	0	1 (11,1)	0	0	0
Identification erronée	0	0	0	2 (14.3 %)	2 (17,7%)
Absence d'identification	0	0	0	1 (7.1 %)	0
Nombre de souches du complexe cepacia		8		13	21
Identification correcte		8 (100 %)		12 (92.3 %)	19 (90.5 %)
Identification avec une faible discrimination		0		0	0
Identification erronée		0		1 (7.7 %)	2 (9.5 %)
Absence d'identification		0		0	0
Nombre de souches de <i>R. mannitolilytica</i>		1			12
Identification correcte		1 (100 %)			10 (83.3%)
Faible discrimination		0			0
Identification erronée		0			2 (17,7%)
Absence d'identification		0			0

Tableau 16 : Evaluation des performances de la carte VITEK 2 GN pour l'identification de *P. aeruginosa*, *A. xylooxidans*, *S. maltophilia*, complexe *B. cepacia* et *R. mannitolilytica* selon les études précédentes et cette étude.

Au cours de cette étude, 7 % des souches (n=9), si l'on considère uniquement les espèces prises en compte par le Vitek 2, ont été incorrectement identifiées. Les erreurs d'identification observées concernent 4 souches de *P. aeruginosa* sur 78, dont 2 mucoïdes, 2 souches de *S. maltophilia* sur 12 dont une probablement de croissance difficile (souche non identifiée puis incorrectement identifiée au cours d'un deuxième passage et correctement identifiée au cours du troisième passage sur le Vitek 2, après 48 heures d'incubation); 2 souches de *R. mannitolilytica* sur 10 et une souche du complexe *cepacia* sur 18. Sur ces 9 souches, l'identification erronée fournie par le VITEK 2 était donnée avec la mention « excellente identification » pour deux souches, avec la mention « très bonne identification » pour trois souches et avec la mention « bonne identification » pour une souche.

De plus, parmi les souches ne faisant pas partie de la base de données du VITEK 2 (n=6), 2 souches de *Pandoraea sp.* ont été incorrectement identifiées ; l'une en *B. bronchiseptica* (excellente identification) et l'autre en *R. paucula* (très bonne identification) et une souche de *B. pyrrocinia* a été identifiée comme étant une souche de *P. fluorescens* (excellente identification). Ainsi, une probabilité élevée d'identification correcte ne permet pas un diagnostic de certitude.

Toute identification de *P. fluorescens*, *S. paucimobilis* (espèces les plus fréquemment identifiées par erreur dans cette étude), ainsi que *B. bronchiseptica* ou *R. paucula*, devrait être considérée avec précaution et mise en cohérence avec les tests phénotypiques usuels.

En conclusion, cette étude sur les performances de la carte VITEK 2 GN pour l'identification des BGNNF est, à notre connaissance la première à s'être intéressée uniquement aux souches issues de patients mucoviscidosiques. La majorité des souches (105 sur 134) ont été recueillies de façon prospective, ce qui a permis de se placer dans les conditions habituelles de travail au laboratoire. La carte VITEK 2 GN présente une performance d'identification des BGNNF relativement satisfaisante étant donné les atypies que présentent les isolats de mucoviscidose ; cependant, les résultats d'identification fournis par cette carte doivent être confrontés aux résultats de l'antibiogramme et à l'aspect de la culture, et au moindre doute, des techniques moléculaires devront être utilisées pour l'identification de ces souches.

**IV. CONFUSION DIAGNOSTIQUE DES ESPECES
HERBASPIRILLUM HUTTIENSE ET
BURKHOLDERIA COMPLEXE CEPACIA PAR
LES TESTS PHENOTYPIQUES : A PROPOS
DE DEUX CAS.**

1- INTRODUCTION

Au cours de la mucoviscidose, les poussées infectieuses du tractus respiratoire survenant sur fond de colonisation microbienne chronique constituent la principale cause de détérioration clinique et de décès des patients. Parallèlement à l'allongement de l'espérance de vie lié à amélioration des traitements (notamment antibiotiques), et au progrès réalisés en matière de diagnostic bactériologique, le spectre bactérien responsable de ces colonisations/infections, encore étroit il ya quelques années, ne cesse de s'étoffer. Parmi les bacilles à Gram négatif non fermentants retrouvés au cours de la mucoviscidose, les espèces du complexe *cepacia* sont particulièrement redoutées en raison du risque d'épidémies et d'apparition du syndrome *cepacia*.

Plusieurs études ont montré le manque d'exactitude des méthodes phénotypiques pour l'identification des espèces du complexe *cepacia* et d'autres espèces de BGNNF et la nécessité de confirmer toute identification douteuse (incohérente avec l'antibiogramme, identification avec une faible discrimination) par une méthode d'identification moléculaire [129,161-168].

L'Observatoire National *Burkholderia Cepacia* (Toulouse, France) créé en 1995, a pour mission d'étudier l'épidémiologie des espèces du complexe *cepacia* et espèces apparentées (*Ralstonia sp.*, *Pandoraea sp.*...) en France et de contrôler ou déterminer l'identification des souches qui sont reçues.

Entre 2004 et 2007, sept souches, dont deux issues d'un même patient, ont été adressées à l'Observatoire pour identification en raison de la discordance entre l'identification phénotypique : complexe *B. cepacia*, et la sensibilité aux antibiotiques incompatible avec ce diagnostic. Ces souches ont été identifiées par la méthode moléculaire ARDRA en tant qu'*Herbaspirillum huttiense*.

Le but de cette étude est de définir, de façon rétrospective, les caractéristiques bactériologiques et cliniques de ces souches.

2- MATERIEL ET METHODES

2.1. Souches bactériennes

Sur les sept souches congelées, seulement deux ont pu être étudiées, (appelées souches 1 et 2), aucune pousse n'ayant été obtenue avec les autres après repiquage. La souche de référence LMG 2199 a été testée parallèlement à ces deux souches. Ces trois souches ont été repiquées sur gélose au sang columbia à deux reprises avant d'être soumise aux divers tests.

2.2. Tests phénotypiques

La morphologie des colonies des trois souches de *H. huttiense* a été étudiée sur divers milieux, dont l'utilisation est recommandée pour les prélèvements respiratoires issus de patients mucoviscidosiques : milieu cétrimide (*P. aeruginosa*), milieu imipénème (*S. maltophilia*) et différents milieux sélectifs pour le complexe *B. cepacia* : BCSA (bioMérieux), rendus sélectifs par la présence de polymyxine B, gentamycine, vancomycine ; cepacia (AES), rendus sélectifs par la présence de polymyxine B et ticarcilline ; et OFPBL (préparé au laboratoire), rendus sélectifs par la présence de polymyxine B et bacitracine. Ces milieux ont été incubés à 37°C et observés tous les jours pendant 5 jours. Une souche appartenant au complexe *B. cepacia* a également été repiquée sur ces milieux pour comparaison.

La caractérisation biochimique des souches a été réalisée par la mise en œuvre de méthodes phénotypiques d'identification : galerie API 20 NE et carte VITEK 2 GN (BioMérieux). La galerie API 20 NE a été inoculée selon les recommandations du fabricant et a été lue après 24 heures et 48 heures d'incubation. Le test de l'oxydase, nécessaire pour l'interprétation de la galerie a été réalisé à l'aide du kit BBL™ DrySlide™ Oxidase (Becton Dickinson). La carte VITEK 2 GN a également été utilisée selon les recommandations du fabricant.

Le test de la catalase a été effectué à l'aide du réactif ID Color Catalase (ID-ASE, bioMérieux).

2.3. Antibiogrammes

La sensibilité aux antibiotiques des souches a été déterminée par la mise en œuvre de la méthode de diffusion conformément aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) concernant les bacilles à Gram négatifs non fermentants. La suspension bactérienne a été déposée par écouvillonnage sur une gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad). Les disques suivants (Bio-Rad) ont été utilisés : ticarcilline (75µg), ticarcilline-acide clavulanique (75/10 µg), piperacilline (75 µg), piperacilline-tazobactam (75/10 µg), ceftazidime (30µg), aztreonam (30 µg), imipénème (10 µg), kanamycine (30 µg), gentamicine (10 UI), tobramycine (10 µg), amikacine (30 µg), colistine (50 µg), ciprofloxacine (5 µg), ofloxacine (5 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (1.25/23.75 µg), et fosfomycine (50 µg).

2.4. Méthode moléculaire de référence (ARDRA)

Cette méthode (Amplified 16S rRNA restriction analysis : ARDRA) a été réalisée au moment de la réception des souches à l'Observatoire selon un procédé précédemment décrit [271,272]. Les profils de restriction obtenus avec les enzymes AluI, HhaI, DdeI, MspI et XmnI ont été comparés avec les profils types.

2.5. Séquençage des souches

Les souches 1 et 2 ont été adressées au Dr Hélène Marchandin (Laboratoire de Bactériologie, CHU de Montpellier) pour la réalisation du séquençage partiel de l'ADNr 16S.

3. RESULTATS

3.1. Coloration de Gram

Les trois souches se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif trapus, parfois incurvés et/ou boursouflés (figure 18)

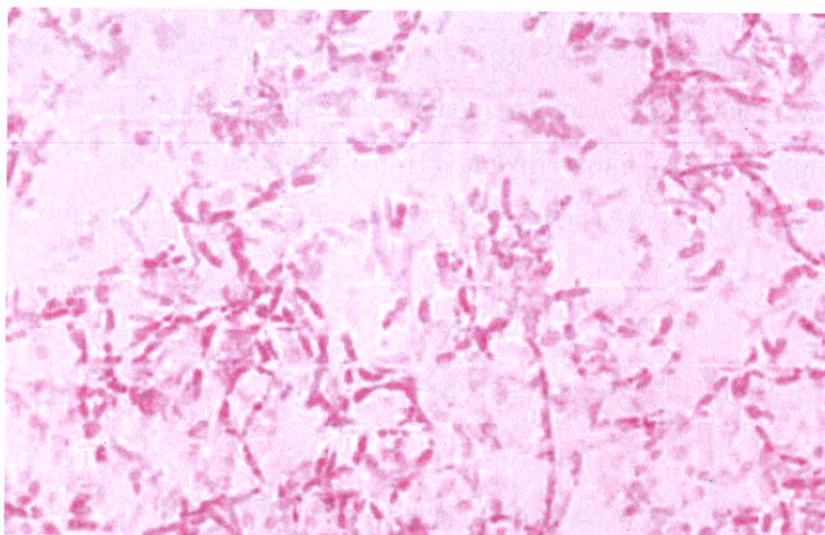


Figure 18 : Coloration de Gram de la souche 2

3.2. Résultats d'identification fournis par la galerie API20NE et la carte VITEK2GN

Les trois souches ont été **identifiées comme appartenant au complexe *B. cepacia*** par les deux techniques phénotypiques.

Les trois souches sont **catalase négative et oxydase positive**.

Les résultats des tests de la galerie API20NE figurent dans le tableau suivant (tableau 17). A l'exception du test d'assimilation du mannose négatif pour la souche LMG 2199 et positif pour les souches 1 et 2, les trois souches présentent le même profil et ont été identifiées avec la mention « excellente » (% identification > 99,9 %) ou « très bonne identification » (% identification > 99 %).

Les résultats des tests de la carte VITEK 2 GN sont présentés sur la figure 19. Les trois souches présentent le même profil et ont été identifiées en tant que complexe *B. cepacia* avec

la mention « très bonne identification » (probabilité 93 à 95%). Les tests suivants sont positifs : utilisation de l'adonitol, L-arabitol, D-glucose, D-mannitol, D-sorbitol, citrate (sodium), malonate, glutamyl arylamidase pNA, gamma-glutamyl-transférase, L-proline arylamidase, tyrosine-arylamidase, uréase, alcalinisation du L-lactate, alcalinisation du succinate, test d'Ellman.

Des discordances entre les résultats des tests des deux techniques ont été notées : le test d'assimilation du D-mannose est positif avec la galerie API 20 NE pour les souches 1 et 2 et négatif avec la carte GN et les trois souches ont un test de β -galactosidase positif avec la galerie et négatif avec la carte. De plus, les trois souches ont un test d'uréase positif avec la carte VITEK 2 GN et négatif avec la galerie API 20 NE.

	Souche 1	Souche 2	Souche de référence LMG 2199
Réduction des nitrates en nitrites	-	-	-
Réduction des nitrates en azote	-	-	-
Formation d'indole	-	-	-
Fermentation glucose	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Uréase	-	-	-
Hydrolyse de l'esculine	-	-	-
Hydrolyse gélatine	-	-	-
β -galactosidase	+	+	+
Assimilation			
- D-glucose	+	+	+
- L-arabinose	+	+	+
- D-mannose	+	+	-
- D-mannitol	+	+	+
- N-acétyl-glucosamine	+	+	+
- D-maltose	-	-	-
- Potassium gluconate	+	+	+
- Acide caprique	+	+	+
- Acide adipique	+	+	+
- Acide malique	+	+	+
- Trisodium citrate	+	+	+
- Acide phénylacétique	+	+	+
Oxydase	+	+	+ lente
CODE	0067577	0067577	0065577
Espèce	<i>B. cepacia</i> (EI)	<i>B. cepacia</i> (EI)	<i>B. cepacia</i> (TBI)

Tableau 17 : Résultats des tests fournis par la galerie API 20 NE pour les trois souches de *H. huttiense*.

N°d'échantillon: LMG 2199
Emplacement: Pas d'examen correspondant (LMG 2199
(00000B4B7BAA) Serial No 1654 INT-01 jan 17 17:07:48
Type: Gram Negative Identification
Etat: FINIE (04,50)
Germe:
Origine:

APPA	-	ADO	+	PyrA	-	lARL	+	dCEL	-	BGAL	-
H2S	-	BNAG	-	AGLTp	+	dGLU	+	GGT	+	OFF	-
BGLU	-	dMAL	-	dMAN	+	dMNE	-	BXYL	-	BAlap	-
ProA	+	LIP	-	PLE	-	TyrA	+	URE	+	dsOR	+
SAC	-	dTAG	-	dTRE	-	CIT	+	MNT	+	SKG	-
lLATk	+	AGLU	-	SUCT	+	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
GlyA	-	ODC	-	LDC	-	lHISa	-	CMT	-	BGUR	-
O129R	-	GGAA	-	lMLTa	-	ELLM	+	LLATa	-		

Niveau de fiabilité : Très bonne identification

Probabilité Germe
95,00 Burkholderia cepacia group

- Profil biochimique avec tests à l'encontre -
Burkholderia cepacia group
URE (0.01)

Realiser des tests supplémentaires. Voir la liste des tests supplémentaires pour l'identification.

- Tests complémentaires pour identifications précises -
Burkholderia cepacia

Burkholderia cepacia	SACCHAROSE (99)	GELATIN (74)	YELLOW (78)	ONPG (99)
Burkholderia multivorans	SACCHAROSE (1)	GELATIN (2)	ONPG (99)	
Burkholderia stabilis	SACCHAROSE (1)	GELATIN (93)	ONPG (1)	
Burkholderia vietnamiensis	SACCHAROSE (99)	GELATIN (0)	YELLOW (0)	ONPG (99)

LOT 241060940 DATE EXP 14-août-2008 (2410 6094 0121 5481)
[iwFA awFA dilP inc04:37:02 ver0192]

Figure 19 : Profil fourni par la carte VITEK 2 GN avec les trois souches de *H. huttiense*.

3.3. Résultats des antibiogrammes

	Souche 1	Souche 2	Souche de référence LMG 2199
Ticarcilline	S	S	S
Ticarcilline + acide clavulanique	S	S	S
Pipéracilline	S	S	S
Pipéracilline/tazobactam	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S
Aztréonam	I	S	I
Imipénème	S	S	S
Gentamycine	S	I	S
Tobramycine	S	S	S
Amikacine	I	I	S
Ofloxacine	S	I	S
Ciprofloxacine	S	I	S
Fosfomycine	R	R	R
Colistine	R	R	S (CMI : 1,5 mg/L)
Cotrimoxazole	S	S	S

Tableau 18 : Antibiogrammes des trois souches de *H. huttiense*.

La sensibilité des souches de *H. huttiense* vis-à-vis des bêta-lactamines (notamment ticarcilline, ticarcilline+acide clavulanique imipénème), et des aminosides contraste avec la résistance habituelle des espèces du complexe *B. cepacia* à ces antibiotiques. A noter que les trois souches présentent une résistance à la fosfomycine. La souche de référence LMG 2199 présente une sensibilité à la colistine, vérifiée par la réalisation d'un E-test (AB BIODISK) permettant de déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice), la CMI critique étant de 2mg/L.

3.4. Résultats des repiquages des souches sur les milieux sélectifs recommandés pour les prélèvements respiratoires issus de patients mucoviscidosiques

Aucune souche n'a poussé sur le milieu à l'imipénème, utilisé pour la mise en évidence de *S. maltophilia*.

Les trois souches de *H. huttiense* ont poussé sur les milieux sélectifs pour *B. cepacia* après 48 heures d'incubation, hormis la souche 1 qui n'est apparue sur le milieu BCSA qu'après 4 jours d'incubation. D'une manière générale, les trois souches ont poussé de manière moins abondante sur le milieu BCSA que sur les milieux OF et Cepacia.

De façon surprenante, les trois souches sensibles à la ticarcilline ont poussé sur milieu cepacia, la souche LMG 2199, sensible à la gentamycine et à la colistine d'après l'antibiogramme, a poussé sur les trois milieux, qui comportent tous de la polymyxine B, et la souche 1 résistante à la colistine et sensible à la gentamycine a poussé sur BCSA qui comporte de la gentamycine et de la polymyxine B.

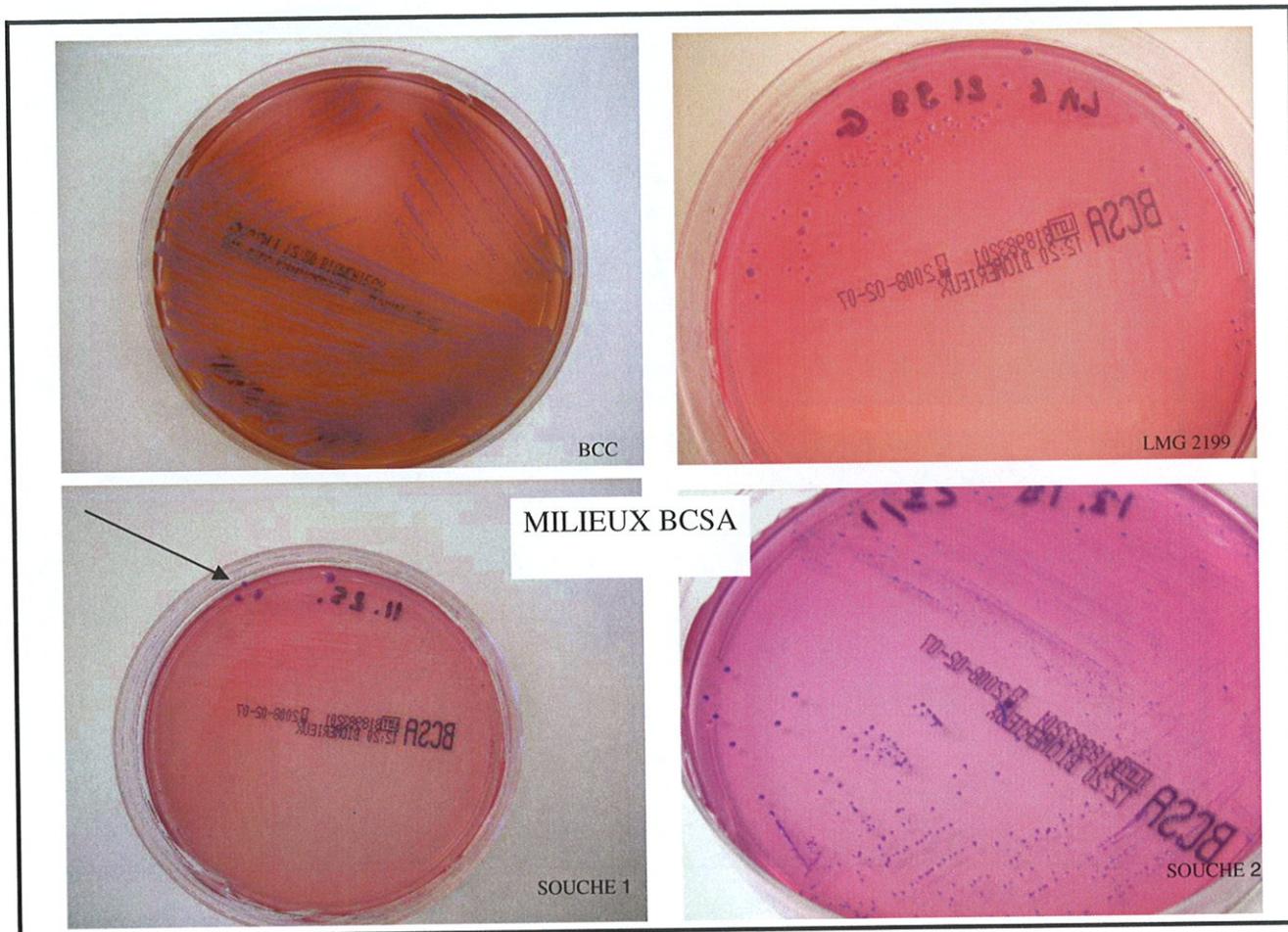


Figure 20: Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d'*H. huttiense* sur milieux BCSA (BioMérieux) après 48 heures d'incubation, sauf pour la souche 1 (4 jours d'incubation). (BCC : *Burkholderia complex cepacia*).

A la différence des colonies de *B. cepacia*, sèches, rugueuses, à contour irrégulier et de couleur gris bleu, et qui entraînent une modification de la couleur du milieu (virage du rose au rouge), les colonies d'*H. huttiense* sont brillantes, légèrement muqueuses, de couleur parme à violette et présentent un contour plus régulier.

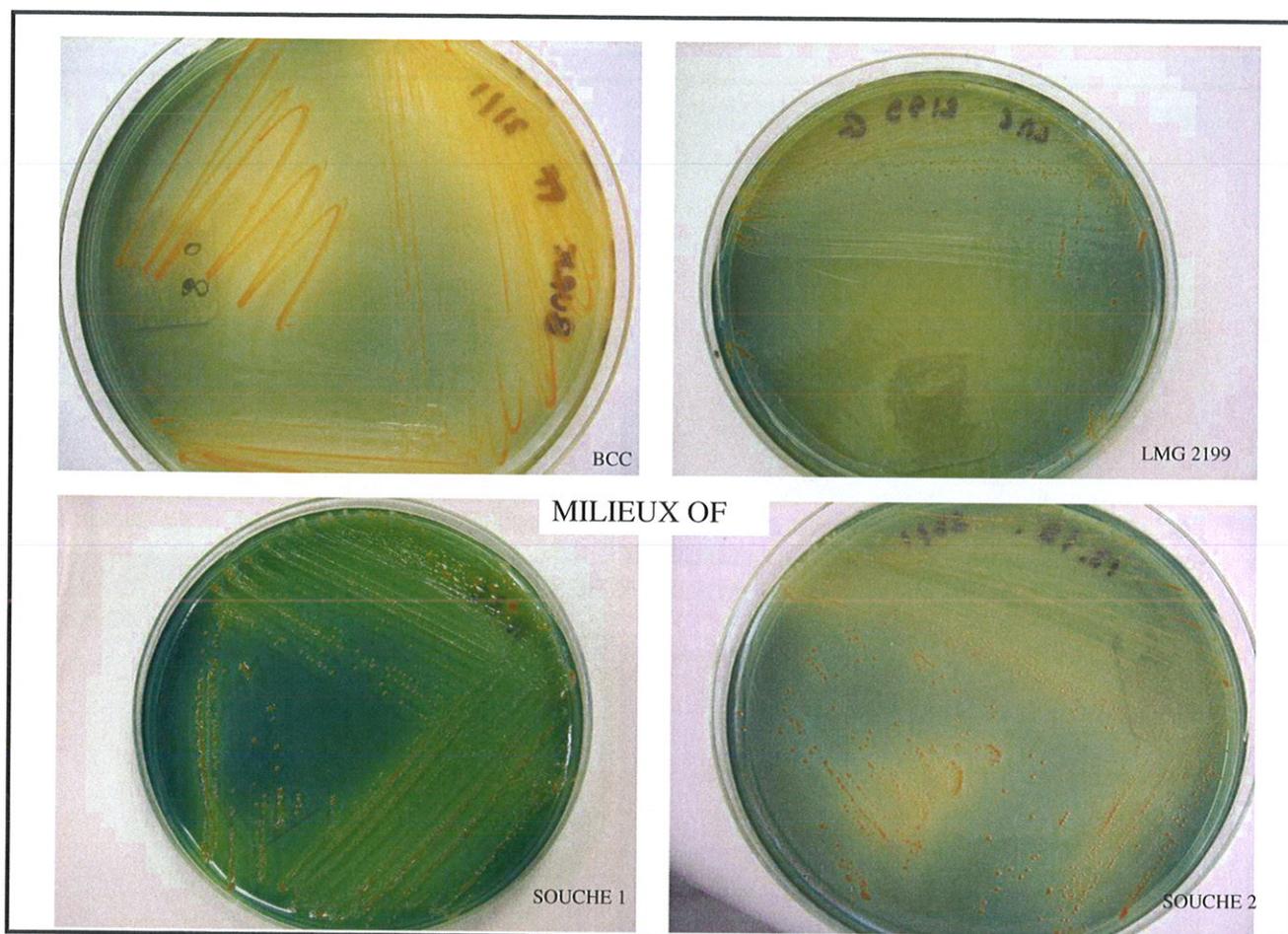


Figure 21 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d'*H. huttienne* sur milieux OF après 48 heures d'incubation.

Sur milieux OF, les colonies de *B. cepacia* sont jaunes-orangées, de petite taille, sèches et rugueuses et entraînent le virage du milieu (vert à jaune) ce qui est dû à l'acidification du lactose. Les colonies de *H. huttienne* sont brillantes, légèrement mucoïdes au bout de 48 heures et présentent un centre orangé et un contour plus clair, jaunâtre et entraînent elles-aussi un virage du milieu. La souche 1, après plusieurs jours d'incubation, est devenue fortement mucoïde, avec une coalescence des colonies.

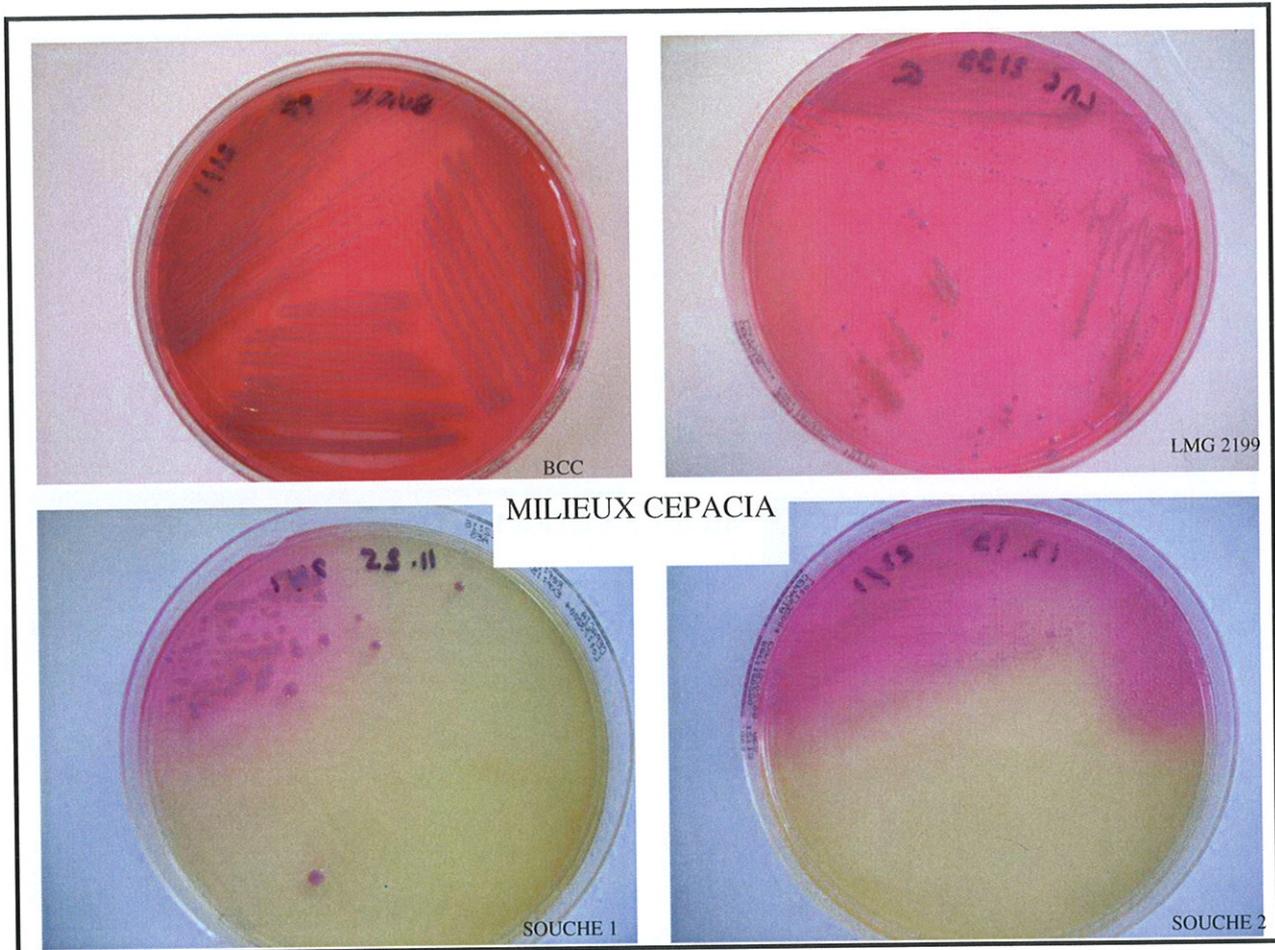


Figure 22 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d'*H. huttiense* sur milieux cepacia (AES) après 48 heures d'incubation.

Les colonies de *H. huttiense* apparaissent sous forme de colonies roses sur le milieu cepacia (AES) et provoquent le virage du milieu du jaune au rose ce qui est lié au métabolisme des pyruvates. Les colonies de *B. cepacia* sont de couleur gris violet et entraînent elles-aussi une modification de coloration du milieu qui devient rose saumon.

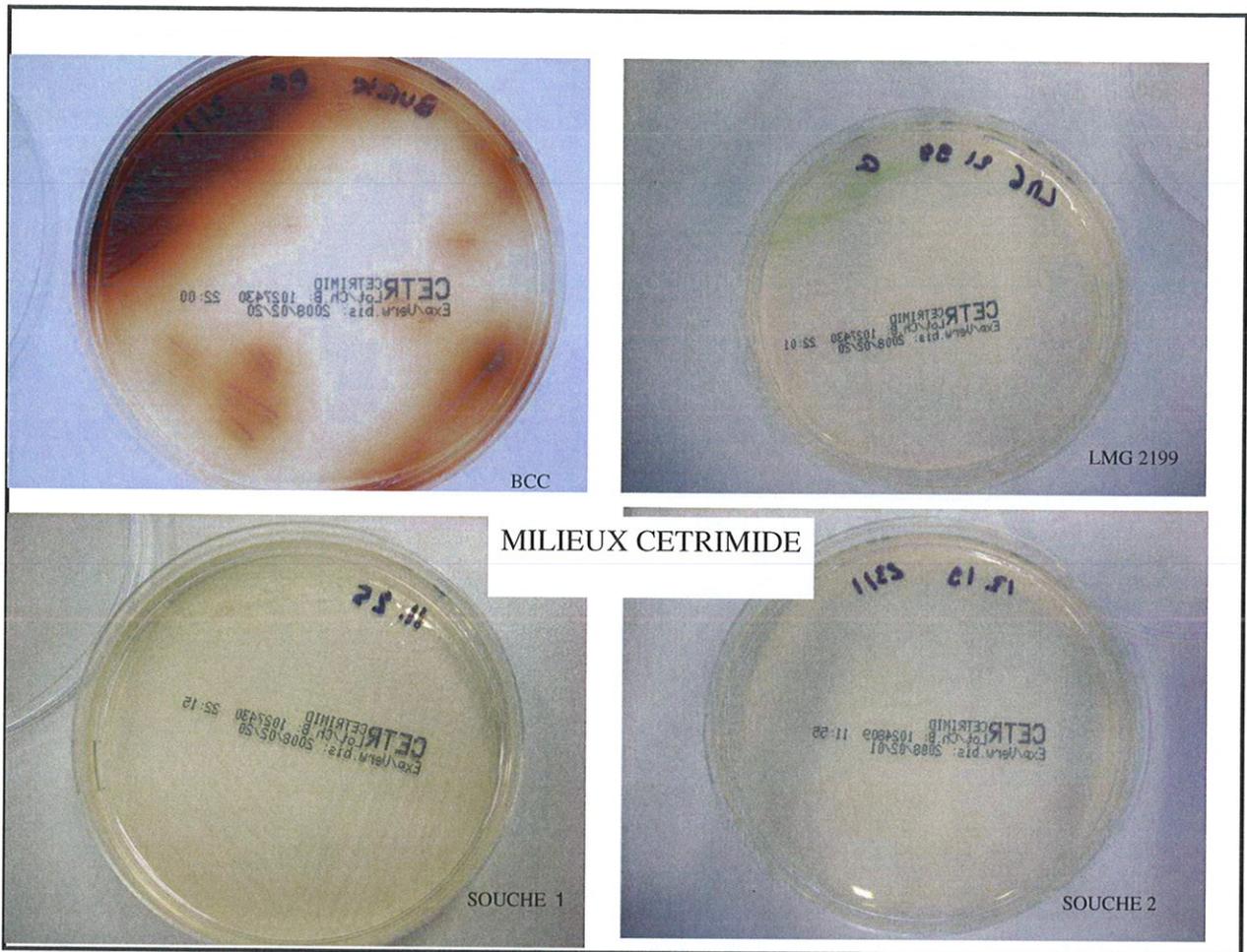


Figure 23 : Aspects des colonies de Bcc et de trois souches d'*H. huttienne* sur milieu cétrimide après 48 heures d'incubation.

La souche de *B. cepacia* a poussé sur milieu cétrimide sous forme de colonies marrons, et de rares colonies blanchâtres (souche 1) et verdâtres (LMG 2199) ont poussé sur ce même milieu. Aucune colonie n'est apparue avec la souche 2.

3.5. Identification des souches par la méthode moléculaire (ARDRA)

Les profils ARDRA des souches 1 et LMG 2199 figurent sur la figure 24.

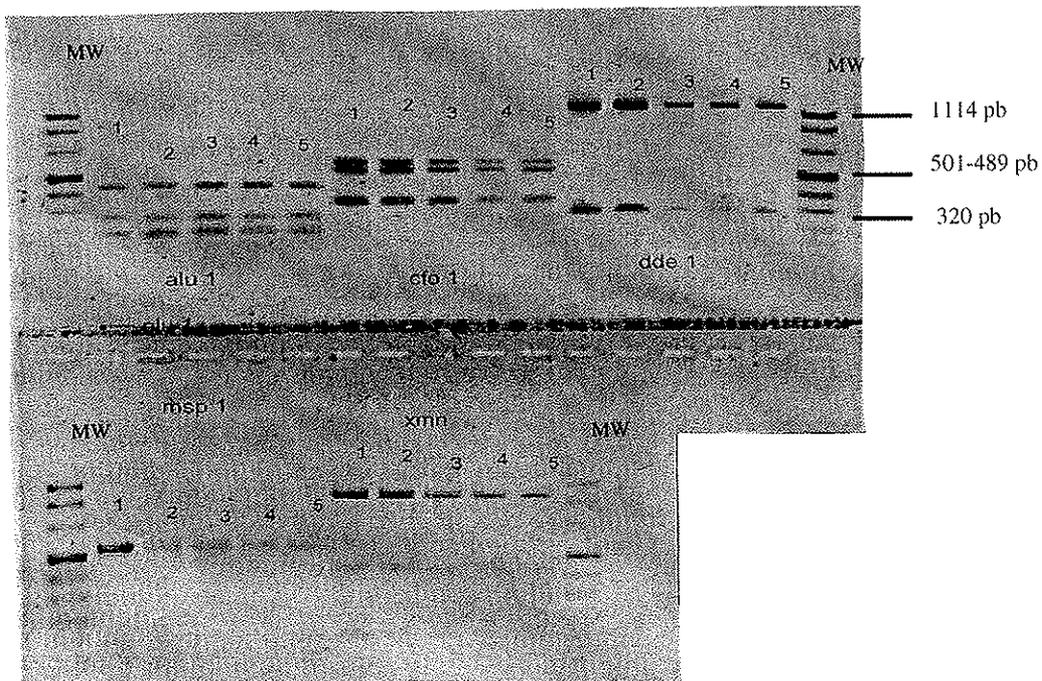


Figure 24 : Profil ARDRA des souches 1 (n°3 sur le gel) et LMG 2199 (souche n°5 sur le gel).
MW : Marqueur de taille

3.6. Séquençage des souches de *H. huttiense*

Le résultat du séquençage partiel de l'ADNr 16S des deux souches d'*Herbaspirillum huttiense* identifiées par la technique ARDRA, n'a pas permis de différencier les deux espèces *Herbaspirillum huttiense* et *Herbaspirillum putei*. Un séquençage complet, qui permettra de trancher entre les deux espèces, sera réalisé ultérieurement.

4- *Herbaspirillum huttiense* : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le genre *Herbaspirillum* a été proposé en 1986 par Baldani et col. [287] pour une unique espèce, *Herbaspirillum seropedicae*. Ultérieurement, ce genre s'est enrichi de neuf autres espèces dont *Herbaspirillum huttiense* (Ding and Yokota 2004) [288] précédemment nommé *Pseudomonas huttiense* par Leifson en 1962. Ce genre fait partie de la classe des bêtaprotéobactéries et de l'ordre des Burkholdérialia.

Les *Herbaspirillum* spp. vivent soit en association avec des graminées ou des légumineuses, soit dans le sol et l'eau. Ces bactéries peuvent augmenter la croissance des plantes et la productivité, ce qui est lié à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (sauf pour *H. huttiense* et *H. autotrophicum*) et à la production de phytohormones telles que des auxines ou des gibbérillines qui favorisent la croissance [289]. Chez l'homme, des isolats appartenant à ce genre ont été mis en évidence dans divers prélèvements (plaies, œil, respiratoire) [290].

H. huttiense a été retrouvé dans l'eau (eau distillée (1962) et au niveau de plants de riz sains dans une rizière [291].

Les *Herbaspirillum* spp. sont des bacilles à Gram négatif, généralement incurvés, mobiles grâce à une ciliature monotriche, à métabolisme respiratoire, pouvant oxyder les sucres, oxydase positive, catalase variable, nitrate réductase variable, possédant une température optimale de croissance comprise entre 25 et 37 °C.

Hormis l'article de Ding et Yokota [288], à visée taxonomique, et de Picoli et col. [292] faisant mention de la présence de cette bactérie sur des explants d'Eucalyptus contaminés, *Herbaspirillum huttiense* a fait l'objet de très peu d'articles. Parmi 51 bactéries inhabituelles isolées à partir de patients mucoviscidosiques et envoyées au laboratoire « B. cepacia Research Laboratory and repository » par les laboratoires de routine pour des investigations plus poussées, une souche, poussant sur BCSA, s'est avérée appartenir à l'espèce *H. huttiense* (identification par analyse des acides gras : FAME (fatty acid methyl esters) et séquençage de l'ADNr16S) [210]. Dans une étude sur l'épidémiologie de *B. cepacia* chez les patients mucoviscidosiques en Italie, parmi 225 souches de *B. cepacia* présumées (identifiées à l'aide de l'API 20 NE et du système BBL Cristal (Becton Dickinson), l'identification en tant que *B. cepacia* a été confirmée pour 208 souches et une des 17 souches restantes a été identifiée comme *H. huttiense* (identification par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) des protéines cellulaires) [293]. Enfin, dans leur étude comparative sur

l'identification de 107 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants par séquençage du gène de l'ARNr16S versus API 20 NE et VITEK 2 GNB, Bosshard et col. ont mis en évidence une souche d' *H. huttiense* (par séquençage). L'identification fournie par la galerie API 20 NE pour cette souche était *B. cepacia* (excellente identification), aucune identification n'était obtenue avec la carte VITEK2GNB [282]. Les souches de cette étude ont été réutilisées pour évaluer la carte colorimétrique VITEK 2 GN, la souche d'*H. huttiense* a été identifiée à tort par cette carte en tant que *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (très bonne identification) [286].

5- *Herbasprillum huttiense* et mucoviscidose : description des cas cliniques.

- Patient 1

La souche 1 a été isolée en août 2007 chez un patient mucoviscidosique de sexe masculin, âgé de 15 ans et porteur d'un génotype delta F508 homozygote. Ce patient avait déjà présenté une colonisation à *H. huttiense* en 2004, la souche de cette première colonisation n'a malheureusement pas pu être étudiée. Cependant, cette colonisation ne semble pas être chronique mais intermittente, dans la mesure où aucune souche d'*H. huttiense* n'a été retrouvée en septembre et en décembre 2007.

Sur le plan microbiologique, ce patient a fait une primo-colonisation à *Pseudomonas aeruginosa* en décembre 1996, à l'âge de 6 ans et demi, traitée avec succès. Il s'est recolonisé en février 2002 avec là aussi une décontamination obtenue. Il est essentiellement porteur de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline et d'*Haemophilus influenzae*. D'autre part, il présente une colonisation chronique à *Aspergillus fumigatus*, avec des sérologies très positives, mais ne présente pas de tableau typique d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

Sur le plan respiratoire, il présente une atteinte modérée avec un VEMS situé en général aux alentours de 70 % et a fait une exacerbation début 2008 avec un VEMS descendu en dessous de 50 %. Enfin, son état nutritionnel est limite avec un IMC à 16,4 kg/m².

- Patient 2

La souche 2 a été isolée en janvier 2006, chez un patient mucoviscidosique de sexe masculin, âgé de 17 ans.

Ce patient a été diagnostiqué à l'âge de 13 mois, et est porteur du génotype 1089X/1089X. Sur le plan clinique, il présente une insuffisance pancréatique, une cirrhose biliaire biologique, traitée par acide urso-désoxycholique, une polypose naso-sinusienne de grade III (ayant nécessité une ethmoïdectomie et une polypectomie) et une bronchopathie chronique obstructive.

Sur le plan biologique, ce patient est colonisé de façon chronique à *S. aureus*. Il a présenté une primocolonisation à *P. aeruginosa* en 1997, à l'âge de 8 ans et demi, une décolonisation ayant été obtenue, et un épisode d'aspergillose bronchopulmonaire immunoallergique, survenu à l'âge de 15 ans.

L'atteinte respiratoire est modérée avec un VEMS situé aux alentours de 70-80 % et hormis de rares épisodes d'exacerbations, ce patient est stable sur le plan respiratoire. Sur le plan microbiologique, son traitement comporte uniquement des antibiotiques antistaphylococciques.

A noter qu'un épisode d'exacerbation clinique (sans diminution du VEMS et de la saturation) est survenu en janvier 2006, au moment où la souche d'*H. huttiense* a été isolée. Le prélèvement, réalisé au moment de cette exacerbation, a révélé la présence de *S. aureus* (++++), d'*H. huttiense* (++) et de rares colonies de *C. albicans*.

H. huttiense n'a pas été réisolé chez ce patient depuis janvier 2006.

5- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les isolats d'*Herbaspirillum huttiense* décrits dans cette étude proviennent de patients mucoviscidosiques et ont été identifiés par la méthode moléculaire ARDRA.

Les résultats des caractères biochimiques suivants : oxydase, réduction des nitrates, arginine dihydrolase, N-acétyl-glucosamine sont en agrément avec ceux trouvés dans l'étude de Ding et Yokota, par contre, l'assimilation du glucose et du mannose, respectivement positive et variable dans notre étude sont négatives dans l'étude de Ding et Yokota ; la catalase est négative dans notre étude, à l'inverse du résultat mentionné dans l'étude de Ding et Yokota.

Le genre *Herbaspirillum sp.* ne fait pas partie de la base des données des systèmes commerciaux, ce qui est lié au faible nombre d'isolats cliniques caractérisés pour l'instant et au fait que la plupart des espèces de ce genre ont été nouvellement décrites. Ainsi, les souches d'*H. huttiense* étudiées dans la présente étude et dans l'étude de Bosshard et col.[282] ont été identifiées à tort en tant que complexe *B. cepacia* par la galerie API20NE. La carte VITEK2GN a identifié les souches de notre étude comme espèces du complexe *cepacia*, et la souche de l'étude de Zbinden et col. [286] comme appartenant à l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. Ces identifications ne sont pas satisfaisantes dans la mesure où les souches du complexe *cepacia* et appartenant au genre *Achromobacter* sont habituellement résistantes aux aminosides ce qui n'est pas le cas des souches testées dans notre étude.

D'après les résultats fournis par le VITEK2, les souches testées au cours de cette étude présentent une activité uréasique, et ce test constitue un « test à l'encontre » de l'identification en tant que «*Burkholderia cepacia group*». Il n'existe, à notre connaissance, aucun document relatant la présence ou l'absence d'une uréase chez les espèces du genre *Herbaspirillum*. S'il s'avérait que les souches d'*H. huttiense* sont systématiquement uréase positive, la présence de cette enzyme pourrait permettre une orientation diagnostique au vu des résultats de la carte VITEK2GN.

L'ensemble des souches d'*H. huttiense* testées ont poussé sur les milieux sélectifs pour *B. cepacia* en dépit du fait qu'une des souches (LMG 2199) était sensible à la gentamycine et à la colistine. Il faut cependant noter que la CMI de la colistine pour cette souche se situe dans des valeurs élevées de CMI (1,5 mg/L) pour une concentration critique de 2 mg/L.

Le résultat du séquençage partiel des deux souches présumées d'*Herbaspirillum huttiense* n'a pas permis de différencier les deux espèces *Herbaspirillum huttiense* et *Herbaspirillum putei*. L'espèce *H. putei* a été décrite en 2004 par Ding et Yokota, à partir d'une seule souche bactérienne et n'a fait l'objet, à notre connaissance, que de cette unique publication. D'après cet article, il semblerait que l'assimilation du D-mannose (positive chez *H. putei* et négative chez *H. huttiense*) permette de faire la distinction entre ces deux espèces bactériennes. Ce caractère s'est avéré être positif, au cours de notre étude avec la galerie API20NE, également utilisée par Ding et Yokota, et négatif avec la carte VITEK2GN. Il reste donc à déterminer si nos deux souches appartiennent véritablement à l'espèce *H. huttiense* grâce à la réalisation d'un séquençage complet.

Les patients inclus dans cette étude ont été colonisés de façon transitoire ou intermittente par *H. huttiense*, retrouvé en faible quantité dans les prélèvements. L'un d'entre eux a présenté une exacerbation au moment de la mise en évidence de cette bactérie, mais l'aggravation de l'atteinte respiratoire a été attribuée à l'infection par *S. aureus*, une élévation de la charge bactérienne de SA ayant été observée à ce moment.

Lors de la mise en évidence de *H. huttiense*, deux hypothèses peuvent être envisagées : celle d'une colonisation à *H. huttiense*, ou celle d'une contamination du prélèvement par ce germe, cette dernière paraissant peu probable dans la mesure où *H. huttiense* a été retrouvé à plusieurs reprises chez un des patients.

En conclusion, *H. huttiense* pourrait constituer un germe émergent dans la mucoviscidose. Cette bactérie est caractérisée par un aspect morphologique typique (bacilles incurvés ou boursoflés), et par la capacité à pousser sur les milieux sélectifs pour *B. cepacia* sous forme de colonies brillantes et légèrement mucoïdes. Ne faisant pas partie de la base des données des systèmes d'identification du commerce, elle est le plus souvent identifiée à tort en tant qu'espèce appartenant au complexe *cepacia* ce qui doit apparaître comme une identification non cohérente avec les résultats de l'antibiogramme. La technique d'identification moléculaire ARDRA constitue une alternative au séquençage tout à fait envisageable pour l'identification de cette bactérie. *H. huttiense* ne semble pas présenter de caractère pathogène particulier chez les patients mucoviscidosiques, mais son rôle doit être évalué sur un plus grand nombre de cas. De même, l'habitat de cette bactérie, la source de contamination et sa transmissibilité restent à déterminer.

CONCLUSION

Au cours de la mucoviscidose, les poussées infectieuses du tractus respiratoire survenant sur fond de colonisation microbienne chronique constituent la principale cause de détérioration clinique et de décès des patients. D'années en années, avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients, et les progrès réalisés en matière de diagnostic bactériologique, le nombre d'espèces bactériennes, et notamment de bacilles à Gram négatif non fermentants, responsables de ces colonisations/infections, n'a cessé d'augmenter. Certaines espèces telles *Inquilinus limosus* ont d'ailleurs été décrites pour la première fois à partir de prélèvements pulmonaires issus de patients mucoviscidosiques.

L'exactitude de l'identification de ce type de germe est primordiale dans la mesure où la prise en charge, en terme de traitement de la colonisation/infection et de mesures de ségrégation des patients (notamment pour *B. cepacia*), varie en fonction de l'espèce bactérienne isolée. Or, les espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants retrouvées dans la mucoviscidose sont parfois difficiles à identifier par les méthodes phénotypiques utilisées en routine, pour les raisons suivantes : 1) elles sont parfois très proches sur le plan phénotypique, 2) certains caractères biochimiques utilisés pour leur identification peuvent avoir disparu (souches mucoïdes de *P. aeruginosa*) 3) et certaines espèces, de description récente ne font pas partie de la base de données des systèmes commerciaux d'identification.

La plupart des méthodes d'identification phénotypiques se sont avérées être peu performantes pour l'identification des BGNNF retrouvés dans le cadre de la mucoviscidose et au moindre doute sur l'identification fournie par ces systèmes, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques moléculaires d'identification (ARDRA, séquençage de l'ADNr16S).

Dans ce travail, nous avons étudié les performances de la carte colorimétrique VITEK 2 GN, mise sur le marché en 2004 et utilisée en routine au laboratoire, pour l'identification de 134 souches de BGNNF issus de mucoviscidose. Il s'agit de la première étude de cette carte, à notre connaissance, réalisée dans le cadre de la mucoviscidose. Avec un pourcentage d'identifications correctes égal à 85,1%, en nette progression comparé à ceux obtenus avec les précédentes cartes, la carte VITEK 2 GN présente une performance d'identification des BGNNF relativement satisfaisante étant donné les atypies que présentent les isolats de

mucoviscidose ; cependant, les résultats d'identification fournis par cette carte doivent être confrontés aux résultats de l'antibiogramme et à l'aspect de la culture, et au moindre doute, des techniques moléculaires devront être utilisées pour l'identification de ces souches.

Il serait intéressant d'étudier les performances de la carte VITEK 2 GN vis à vis d'autres souches bactériennes non testées dans ce travail et pouvant être retrouvées dans la mucoviscidose telles que les souches SCV de *P. aeruginosa*, *B. gladioli*, *R. pickettii*, *C. indologenes*, *Elizabethkingia meningosepticum*, et *C. gleum*.

Dans le futur, les performances de cette carte pourront être améliorées par l'intégration des espèces *B. dolosa* et *B. pyrrocinia* et des genres *Pandoraea*, et *Inquilinus* dans la base de connaissance du VITEK 2.

Au cours de ce travail, nous avons également mis en évidence le risque de confusion de l'espèce *Herbaspirillum huttiense* avec les espèces du complexe *cepacia* par les méthodes d'identification phénotypiques (API 20 NE et VITEK 2 GN). Or, en raison des conséquences de la mise en évidence de *B. cepacia* chez des patients mucoviscidosiques sur le traitement, la ségrégation des patients et sur l'accès à la transplantation, il est primordial de différencier *H. huttiense* des espèces du complexe *cepacia*. Les patients étudiés ont présenté une colonisation transitoire ou intermittente à *H. huttiense* et aucune détérioration de leur fonction pulmonaire n'a été imputée à cette colonisation. Bien que cette espèce ne semble pas présenter de caractère pathogène particulier chez les patients mucoviscidosiques, son rôle pathogène devra être déterminé sur un plus grand nombre de cas.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] La partie historique du Livre blanc. 1965-2005 : quarante ans d'espoir et de combat. Vaincre la mucoviscidose. [enligne]. Disponible sur : http://www.gsk.fr/gsk/mecenat/pdf/lvrebanc2005_historique.pdf (consulté le 10 novembre 2007).
- [2] Tullis E. Living with cystic fibrosis. *Cystic fibrosis: past, present and future. Hum Health Care Int* v. 13, no. 2 (summer 1997).
- [3] Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Mar; 173(5):475-82.
- [4] Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to disease. *Pediatrics* 1953; 12: 549-563.
- [5] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-549.
- [6] Fanen P, Hasnain A. Mucoviscidose et Gène CFTR. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* September 2001. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/CisticFibFr.html> [consulté le 25/09/2007].
- [7] Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-1080.
- [8] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
- [9] Munck A., Navarro J., Lenaerts C. Physiopathologie de l'appareil digestif (tube digestif, foie, voies biliaires). In : Navarro J., Bellon G., éd. *La mucoviscidose, de la théorie à la pratique.* Montpellier : Éditions Espaces 34, 101-120.
- [10] Maisonneuve P, FitzSimmons SC, Neglia JP, Campbell PW 3rd, Lowenfels AB. Cancer risk in nontransplanted and transplanted cystic fibrosis patients: a 10-year study. *J Natl Cancer Inst* 2003 Mar 5;95(5):381-7.
- [11] Levy P. Histoire naturelle de l'insuffisance pancréatique exocrine. *Hépto-Gastro. Volume 9, Numéro 2, 115-22, 2002.*
- [12] Mély L, Sakr S. Manifestations digestives de la mucoviscidose au delà de la période néonatale. *Epidémiologie, signes cliniques, indications d'imagerie. Congrès Marseille SFIP 2005 ;* URL : <http://www.sfip-radiopediatrie.org/SFIPoldpages/SFIPMA05/EPU3MAR05.HTM> [consulté le 25/09/2007].
- [13] Labruno P. Atteinte hépto-biliaire de la mucoviscidose *Médecine thérapeutique. Volume 3, Number 6, 459-64, 1997.*
- [14] Lacaille F. Foie et mucoviscidose. *Gastroenterol Clin Biol.* 1997;21(8-9):607-18.

- [15] Bellon G., Döring G. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire. In : Navarro J., Bellon G., éd. La mucoviscidose, de la théorie à la pratique. 1995 Montpellier : Éditions Espaces 34,85-87.
- [16] Bellon G. Quel est le poids de l'infection respiratoire dans l'évolution de la mucoviscidose. In : Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Conférence de consensus. Paris. Novembre 2002. 1-10.
- [17] Bellon G., Gilly R., Brun O. Manifestations respiratoires et prise en charge. In : Navarro J., Bellon G., éd. La mucoviscidose, de la théorie à la pratique. 1995 Montpellier : Éditions Espaces 34, 153-163.
- [18] Foucaud P., Borel B., Béal G., Bellaïche M., Lenoir S., Missonnier S. La mucoviscidose chez l'enfant Médecine thérapeutique. Volume 3, Numéro 6, 443-9, 1997.
- [19] Chabanon G., Segonds C., Marty N., Dournes JL., Agueda L. Aspects microbiologiques des infections pulmonaires au cours de la mucoviscidose. Médecine thérapeutique. Volume 3, Numéro 6, 451-7, 1997.
- [20] Marcelli F., Robin G., Mitchell V., Dumur V., Puech P., Lemaitre L., Rigot JM. Place de l'imagerie des voies séminales profondes dans le diagnostic d'une agénésie déférentielle unilatérale : à propos d'un patient ayant des mutations du gène CFTR Progrès en Urologie (2006), 16, 617-619.
- [21] Jarzabek K, Zbucka M., Pepiński W., Szamatowicz J., Domitrz J., Janica J., Wolczyński S., Szamatowicz M. Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol.* 2004 Jul; 4(2):119-29.
- [22] Botton E., Saraux A., Laselve H., Jousse S. and Le Goff P. Les manifestations rhumatologiques de la mucoviscidose: Musculoskeletal manifestations in cystic fibrosis *Revue du Rhumatisme*, Volume 70, Issue 9, 2003, 703-712.
- [23] Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 15; 168 (8): 918-51.
- [24] Munck A, Sahler C, Briard M, Vidailhet M, Farriaux JP. Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results. *Arch Pediatr.* 2005; 12(6): 646-9.
- [25] Macek M Jr, Mackova A, Hamosh A, Hilman BC, Selden RF, Lucotte G, Friedman KJ, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(5):1122-7.
- [26] Observatoire national de la mucoviscidose. Bilan des données 2004. Vaincre la Mucoviscidose et Ined, Paris 2006.
- [27] Boutrelle A, Vallier N., Gaspari F., Pépin S., Weill A. - Prise en charge de la mucoviscidose en affection de longue durée. Points de repère n° 7 – mars 2007.
- [28] Bellis G. Le même souffle. Le magazine de l'association SOS mucoviscidose. Avril, mai, juin 2007.
- [29] Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2005 Annual Report. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation; 2006.

- [30] Girodon E., Costes B., Caseneuve C., Fanen P, Goossens M. Génétique de la mucoviscidose. Médecine thérapeutique. Volume 3, Numéro 6, 431-41, 1997.
- [31] Carillo S. Histologie de l'appareil Respiratoire. Voies aériennes profondes. L'appareil broncho-pulmonaire Novembre 2004 [en ligne]. Disponible sur : http://www.med.univ-montpl.fr/Enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-integres/MI2_cardio_pneumo/Ressources_locale/histo_resp_voiesprof_nov2004.pdf (consulté le 6.01.2007).
- [32] Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999; 79(1 Suppl):S145-66.
- [33] Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997; 10(2):135.
- [34] Marchand M. Jarreau C., Chauffert M., Garcia I., Asselin D., Thouvenot JP., Genest AF. Le test de la sueur. *Annales de Biologie Clinique.* Volume 56, Numéro 2, 215-21, 1998.
- [35] Matran R., Perez T., Neve V., Robin S., Neviere R. Actualités sur les explorations diagnostiques de la mucoviscidose. *Rev Mal Respir* 2003 ; 20 : S25-S29.
- [36] Feldmann D. Mucoviscidose : un dépistage pour toute la France. *Annales de Biologie Clinique.* Volume 60, Numéro 6, 693-5, 2002.
- [37] Farriaux J.-P. Neonatal screening for cystic fibrosis: a new program in France and a new challenge *Annales de Biologie Clinique.* Vol. 60, Number 1, 13-4, 2002.
- [38] Claustres M. Génétique, dépistage et épidémiologie de la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie.* Volume 1, Numéro 3, 261-8, Mai-Juin 1998.
- [39] De Braekeleer, Bellis G : Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM) : structure de l'observatoire et résultats de l'enquête 1999. Référence mucoviscidose, Edition Elsevier 2001 : 42-8.
- [40] Sardet A. Infections à *Staphylococcus aureus* : quand et comment traiter ? Conférence de consensus- Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Paris –Palais du Luxembourg-18, 19 novembre 2002.
- [41] Goerke C, Matias y Papenberg S, Dasbach S, Dietz K, Ziebach R, Kahl BC, Wolz C. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J Infect Dis.* 2004; 189(4):724-34.
- [42] Moore, P.C.L., and Lindsay, J.A. (2001) Genetic Variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(8):2760-7.
- [43] Kahl, B.C., Mellmann, A., Deiwick, S., Peters, G., and Harmsen, D. (2005) Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1):502-5.
- [44] Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breitkopf C, Wardecki K, Stern M, Wolz C, Kahl BC. High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol.* 2007; 9(12):3134-42.

- [45] Kahl BC, Belling G, Becker P, Chatterjee I, Wardecki K, Hilgert K, Cheung AL, Peters G, Herrmann M. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun*. 2005; 73(7):4119-26.
- [46] Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(1):168-72.
- [47] Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4424-7.
- [48] Le Bourgeois M., Vrielynck S. Infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005 mai-juin Vol 8, N° 3, 175-81.
- [49] Chabanon G, Segonds C, Quels critères microbiologiques pour définir une colonisation ou une infection à *Staphylococcus aureus* ? -Conférence de consensus- Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Paris -Palais du Luxembourg- 18, 19 novembre 2002.
- [50] Hutchison ML, Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect*. 1999; 1(12):1005-14.
- [51] Román F, Cantón R, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(4):1450-9.
- [52] Möller LV, Regelink AG, Grasselie H, Dankert-Roelse JE, Dankert J, van Alphen L. Multiple *Haemophilus influenzae* strains and strain variants coexist in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1995; 172(5):1388-92.
- [53] Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr*. 1993 Jun; 122(6):854-60.
- [54] Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, Green CG, Collins J, Farrell PM. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 32(4):277-87.
- [55] Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; 34(2):91-100.
- [56] Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Grimwood K. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001; 138(5):699-704.
- [57] Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV, Michelsen PB. Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(1):35-40.

- [58] Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2001; 183(3):444-52.
- [59] West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA.* 2002; 287(22):2958-67.
- [60] Maselli JH, Sontag MK, Norris JM, MacKenzie T, Wagener JS, Accurso FJ. Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 2003; 35(4):257-62.
- [61] Römling, U., J. Wingender, H. Müller, and B. Tümmler. 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1734–1738.
- [62] Tredgett M.W., Doherty C., Govan J.R.W., Incidence of common pyocin types of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis, and chronic airways disease, *J. Med. Microbiol.* 32 (1990) 169–172.
- [63] Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthalingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166 (7):988-93.
- [64] Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet.* 1996; 348 (9028):639-42.
- [65] Scott FW, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol.* 2004; 53(Pt 7):609-15.
- [66] Panagea S, Winstanley C, Walshaw MJ, Ledson MJ, Hart CA. Environmental contamination with an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. *J Hosp Infect.* 2005; 59(2):102-7.
- [67] Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, Bigham A, Carlin JB, Robins-Browne RM, Grimwood K. Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(7):983-7.
- [68] Armstrong D, Bell S, Robinson M, Bye P, Rose B, Harbour C, Lee C, Service H, Nissen M, Syrmis M, Wainwright C. Evidence for spread of a clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* among cystic fibrosis clinics. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):2266-7.
- [69] Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenzen JA, Høiby N, Molin S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun.* 2007; 75 (5):2214-24.
- [70] Römling U, Kader A, Sriramulu DD, Simm R, Kronvall G. Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ Microbiol.* 2005; 7(7):1029-38.
- [71] Jung A, Kleinau I, Schonian G, Bauernfeind A, Chen C, Griese M, Doring G, Gobel U, Wahn U, Paul K. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2002;20:1457–1463.

- [72] Plésiat P. Quels critères microbiologiques pour définir une colonisation ou une infection à *Pseudomonas aeruginosa*? In : Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Conférence de consensus. Paris. Novembre 2002. 32-39.
- [73] Société française de Microbiologie. Examen bactériologique des sécrétions bronchopulmonaires chez un sujet mucoviscidosique. In : Le REMIC, référentiel en microbiologie médicale. Vivactis Plus Ed., 2007, p35-38.
- [74] Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, and Touw DJ for the consensus committee. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000; 16: 749-767.
- [75] Gómez MI, Prince A. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. Curr Opin Pharmacol. 2007; 7(3):244-51.
- [76] Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54:1359-1371.
- [77] Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J. 2004; 23(1):146-58.
- [78] Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2):194-222.
- [79] Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 1996; 60(3):539-74.
- [80] Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(7): 3019-3023.
- [81] de Bentzmann S, Roger P, Dupuit F, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, Plotkowski MC, Puchelle E. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. Infect Immun 1996; 64:1582-1588.
- [82] Schroeder TH, Zaidi TS, Pier GB. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM on epithelial cells. Infect Immun 2001; 69:719-729.
- [83] Plotkowski MC, Costa AO, Morandi V, Barbosa HS, Nader HB, de Bentzmann S, Puchelle E. Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. J Med Microbiol 2001; 50:183-190.
- [84] Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:12088-12093.
- [85] Schroeder TH, Reiniger N, Meluleni G, Grout M, Coleman FT, Pier GB. Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. J Immunol 2001; 166:7410-7418.

- [86] Coleman FT, Mueschenborn S, Meluleni G, Ray C, Carey VJ, Vargas SO, Cannon CL, Ausubel FM, Pier GB. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:1949–1954.
- [87] Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerçeker AA, Golan DE, Pier GB. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(10):6907-12.
- [88] Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; 85:229–236.
- [89] Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. 1997 Feb 21; 88(4):553-60.
- [90] Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002; 23:5–27.
- [91] Ciofu O, Petersen TD, Jensen P, Hoiby N. Avidity of anti-*P aeruginosa* antibodies during chronic infection in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1999; 54:141–144.
- [92] Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(4):551-60.
- [93] Mayaud C; Groupe ECRIR. *Pseudomonas* and bronchial diseases *Med Mal Infect*. 2007;37(6):300-4.
- [94] Bingen E. Données bactériologiques. In : Navarro J, Bellon G. *La mucoviscidose ; de la théorie à la pratique*. 1995. Montpellier: ed. Espaces 34; 57-78.
- [95] Fegan M, Francis P, Hayward AC, Davis G, HG, Fuerst JA: Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1143-6.
- [96] Wu W, Badrane H, Arora S, Baker HV, Jin S. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2004; 186(22):7575-85.
- [97] Boucher, J. C., H. Yu, M. H. Mudd, and V. Deretic. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun*. 1997. 65:3838–3846.
- [98] Anthony, M., B. Rose, M. B. Pegler, M. Elkins, H. Service, K. Thamotharampillai, J. Watson, M. Robinson, P. Bye, J. Merlino, and C. Harbour. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol*. 2002. 40:2772–2778.
- [99] Lizewski SE, Schurr JR, Jackson DW, Frisk A, Carterson AJ, Schurr MJ. Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis. *J Bacteriol*. 2004; 186(17):5672-84.

- [100] Bergan T, Hoiby N. Epidemiological markers for *Pseudomonas aeruginosa*: relationship between concomitant non-mucoid and mucoid strains from the respiratory tract in cystic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 1975; 83:553-560.
- [101] Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1994; 62(2):596-605.
- [102] Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA.* 2005; 293(5):581-8.
- [103] Häussler S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 2004; 6(6):546-51.
- [104] Häussler S, Ziegler I, Löttel A, von Götz F, Rohde M, Wehmhöner D, Saravanamuthu S, Tümmler B, Steinmetz I. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol.* 2003; 52(Pt 4):295-301.
- [105] von Götz F, Häussler S, Jordan D, Saravanamuthu SS, Wehmhöner D, Strüssmann A, Lauber J, Attree I, Buer J, Tümmler B, Steinmetz I. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 2004; 186(12):3837-47.
- [106] Filloux A, Vallet I. Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci (Paris).* 2003; 19(1):77-83.
- [107] Merlo CA, Boyle MP, Diener-West M, Marshall BC, Goss CH, Lechtzin N. Incidence and risk factors for multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Chest.* 2007; 132(2):562-8.
- [108] Denton M. and Kerr KG. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(1): 57-80.
- [109] Denton M. May, 2001. *Stenotrophomonas maltophilia*-questions and answers [en ligne]. Leeds University Teaching Hospitals, Leeds, UK. Disponible sur : <http://www.cysticfibrosismedicine.com/index.html> [consulté le 4/02/2008].
- [110] Whitby PW, Carter KB, Burns JL, Royall JA, LiPuma JJ, Stull TL. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(12):4305-9.
- [111] Gladman G, Connor PJ, Williams RF, David TJ. Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1992; 67:192-195.
- [112] Demko CA, Stern RC, Doershuk CF. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25: 304-308.
- [113] Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(3):356-61.
- [114] Karpati F, Malmberg AS, Alfredsson H, Hjelte L, Strandvik B. Bacterial colonisation with *Xanthomonas maltophilia*--a retrospective study in a cystic fibrosis patient population. *Infection.* 1994; 22(4):258-63.

- [115] Klinger J D, Thomassen M J. Occurrence and antimicrobial susceptibility of gram-negative non-fermentative bacilli in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1985; 3:149-158.
- [116] Ballesteros S, Virseda I, Escobar H, Suarez L, Baquero F. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14: 728-729.
- [117] Marchac V., Equi A., Le Bihan-Benjamin C., Hodson M., Bush A. Case-control study of *Stenotrophomonas maltophilia* acquisition in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2004; 23: 98-102.
- [118] Talmaciu, I, Varlotta, L, Mortensen, J, and al. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2000; 30:10-15.
- [119] Denton, M, Todd, NJ, Littlewood, JM. Role of anti-pseudomonal antibiotics in the emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15: 402-405.
- [120] Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (7) : 1953-8.
- [121] Krzewinski JW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3597-3602.
- [122] Denton M, Rajgopal A, Mooney L, Qureshi A, Kerr KG, Keer V, Pollard K, Peckham DG, Conway SP. *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. *J Hosp Infect.* 2003; 55 (3):180-3.
- [123] Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol.* 1996; 178(18):5472-9.
- [124] Ganadu M, Mura GL, Campus AM, Cherchi GL, Fanelli V, Calvisi L, Canu G, Cherchi GB. Relapsing pyrogenic reactions due to *Xanthomonas maltophilia* in a dialysis patient with a long-term central venous catheter. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11(1):197-8.
- [125] Grover S, Odell W D. Partial characterisation of the 30 kD Ig-binding protein from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 182:1075-1081.
- [126] Kerr, K G.; Hawkey, P M. Abstracts of the 2nd International Symposium on Febrile Neutropenia 1995. Serum resistance of clinical and environmental strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, abstr. 29.
- [127] Waters VJ, Gómez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, Prince A. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun.* 2007; 75(4):1698-703.
- [128] Kerr KG, Denton M, Todd N, Corps CM, Kumari P, Hawkey PM. A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15 (7):607-10.

- [129] McMenamin, J. D., T. M. Zaccone, T. Coenye, P. Vandamme, and J. J. LiPuma. 2000. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest* 117:1661-1665.
- [130] Whitby PW, Carter KB, Burns JL, Royall JA, LiPuma JJ, Stull TL. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(12):4305-9.
- [131] Philippon A. β -lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. *Antibiogramme*. 2ième édition. 2006. Ed ESKA. 187-190.
- [132] Yabuuchi, E., and A. Ohyama. 1971. *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge. *Jpn. J. Microbiol.* 15: 477-481.
- [133] Yabuuchi, E., and I. Yano. 1981. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:477-478.
- [134] Kersters, K., and J. De Ley. 1984. Genus *Alcaligenes*, p. 361-373. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Syst. Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md.
- [135] Yabuuchi, E., Y. Kawamura, Y. Kosako, and T. Ezaki. 1998. Emendation of the genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ru'ger and Tan) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 42:429-438.
- [136] Igra-Siegmán Y, Chmel H, Cobbs C. Clinical and laboratory characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* infection. *J Clin Microbiol.* 1980; 11(2):141-5.
- [137] Spear JB, Fuhrer J, Kirby BD. *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(3):598-9.
- [138] Ahn Y, Kim NH, Shin DH, Park OY, Kim W, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC. Pacemaker lead endocarditis caused by *Achromobacter xylosoxidans*. *J Korean Med Sci.* 2004; 19(2):291-3.
- [139] Granowitz EV, Keenholz SL. A pseudoepidemic of *Alcaligenes xylosoxidans* attributable to contaminated saline. *Am J Infect Control.* 1998; 26(2):146-8.
- [140] Reverdy ME, Freney J, Fleurette J, Coulet M, Surgot M, Marmet D, Ploton C. Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. *J Clin Microbiol.* 1984; 19(2):140-3.
- [141] Vu-Thien H, Darbord JC, Moissenet D, Dulot C, Dufourcq JB, Marsol P, Garbarg-Chenon A. Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17(10):724-6.
- [142] U.S. CF Foundation, Patient Registry 1995, 1996, 1997, 1999, 2002 Annual Report. Bethesda, Maryland.
- [143] Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW, Clausen CR. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(1):158-63.

- [144] Tan K, Conway SP, Brownlee KG, Etherington C, Peckham DG. *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(2):101-4.
- [145] Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahl A, Gielen J, Bärmeier H, Ratjen F; Emerging Bacteria Study Group. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005; 4 (1):41-8.
- [146] De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros.* 2007; 6(1):75-8.
- [147] Alexandrou-Athanasoulis H., Doudounakis S., Sergounioti A., Halmouki K., Pangalis A. *Achromobacter xylosoxidans* from the airway secretions of patients with cystic fibrosis. In : 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice, France, April 1-4 2006. p1362.
- [148] Saiman L, Chen Y, Tabibi S, San Gabriel P, Zhou J, Liu Z, Lai L, Whittier S. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(11):3942-5.
- [149] Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL, LiPuma JJ. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (4): 1210-3.
- [150] Wellinghausen N, Wirths B, Poppert S. Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of *Achromobacter xylosoxidans* and *Alcaligenes faecalis* recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (9):3415-7.
- [151] Dunne WM Jr, Maisch S. Epidemiological investigation of infections due to *Alcaligenes species* in children and patients with cystic fibrosis: use of repetitive-element-sequence polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(4):836-41.
- [152] Rønne Hansen C, Pressler T, Højby N, Gormsen M. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. *J Cyst Fibros.* 2006; 5(4):245-51.
- [153] Cheron M, Abachin E, Guerot E, el-Bez M, Simonet M. Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(4):1023-6.
- [154] Vu-Thien H, Moissenet D, Valcin M, Dulot C, Tournier G, Garbarg-Chenon A. Molecular epidemiology of *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* in a cystic fibrosis center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15(11):876-9.
- [155] Moissenet D, Baculard A, Valcin M, Marchand V, Tournier G, Garbarg-Chenon A, Vu-Thien H. Colonization by *Alcaligenes xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(2):274-5.
- [156] Peltroche-Llacsahuanga H, Haase G, Kentrup H. Persistent airway colonization with *Alcaligenes xylosoxidans* in two brothers with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17(2):132-4.
- [157] Kanellopoulou M, Pournaras S, Iglezos H, Skarmoutsou N, Papafrangas E, Maniatis AN. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* clone. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23(4):336-9

- [158] Van Daele, Verhelst R, Claeys G, Verschraegen G S, Franckx H, Van Simaey L, de Ganck C, De Baets F, Vaneechoutte M. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2998-3002.
- [159] Philippon A. β -lactamines et bacilles à Gram négatif non fermenteurs. In : Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. *Antibiogramme*. 2ième édition. 2006. Ed ESKA. 190-192.
- [160] Neuwirth C, Freby C, Ogier-Desserrey A, Perez-Martin S, Houzel A, Péchinot A, Duez JM, Huet F, Siebor E. VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(11):1737-9.
- [161] LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* Complex as Human Pathogens. *Journal of Nematology* 35(2):212-217. 2003.
- [162] Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: An emerging problem. *J Pediatr*. 1984;104(2):206-10.
- [163] Thomassen, M. J., C. A. Demko, J. D. Klinger, and R. C. Stern. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis : A new opportunist. *American Review of Respiratory Diseases* 131:791-796.
- [164] Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(10):3427-36.
- [165] Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47(4):1188-200.
- [166] Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros*. 2004; 3(2):93-8.
- [167] Vandamme, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and J. R. W. Govan. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res Microbiol*. 2003; 154(2):91-6.
- [168] Marolda CL, Hauröder B, John MA, Michel R, Valvano MA. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology*. 1999; 145 (Pt 7):1509-17.
- [169] Holmes A, Govan J, Goldstein R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(2):221-7.
- [170] Segonds C., Chabanon G. *Burkholderia cepacia* : les dangers d'un micro-organisme phytopathogène pour les patients atteints de mucoviscidose. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 59, Numéro 3, 259-69, Mai - Juin 2001.
- [171] Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(2):144-56.
- [172] McCloskey M, McCaughan J, Redmond AOB, Elborn JS. Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Ir J Med Sci* 2001; 170(1):28- 31.

- [173] Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, et al. *Pseudomonas cepacia* colonisation in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr* 1985; 107:382–7.
- [174] Brown P, Butler S, Nelson J, Doherty C, Govan J, Greening A. *Pseudomonas cepacia* in adult cystic fibrosis: accelerated decline in lung function and increased mortality. *Thorax* 1993; 48:425–426.
- [175] LiPuma JJ, Dansen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with CF. *Lancet* 1990; 336:1094–1096.
- [176] Govan JRW, Brown PH, Maddison J, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993;342:15–19.
- [177] Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr*. 1994; 124(5 Pt 1):694-702.
- [178] LiPuma, J. J., Spilker, T., Coenye, T. & Gonzalez, C. F. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet*. 2002; 359(9322):2002-3.
- [179] Ramette, A., J. J. LiPuma, and J. M. Tiedje. 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1193-1201.
- [180] Reik R, Spilker T, Lipuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6):2926-8.
- [181] Kidd TJ, Bell SC, Coulter C. Genomovar diversity amongst *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Australian adult cystic fibrosis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22(7):434-7.
- [182] McDowell A, Mahenthiralingam E, Dunbar KE, Moore JE, Crowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol.* 2004; 53(Pt 7):663-8.
- [183] De Boeck K, Malfroot A, Van Schil L, Lebecque P, Knoop C, Govan JR, Doherty C, Laevens S, Vandamme P; Belgian Burkholderia cepacia Study Group. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonisation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J.* 2004; 23(6):851-6.
- [184] Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, Bidet P, Loukil C, Chabanon G, Lange M, Bingen E. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (10): 4824-7.
- [185] Lambiase A, Raia V, Stefani S, Sepe A, Ferri P, Buonpensiero P, Rossano F, Del Pezzo M. *Burkholderia cepacia* complex infection in a cohort of Italian patients with cystic fibrosis. *J Microbiol.* 2007; 45(3):275-9.
- [186] Sun, L., R.-Z. Jiang, S. Steinbach, A. Holmes, C. Campanelli, J. Forstner, U. Sajjan, Y. Tan, M. Riley, and R. Goldstein. 1995. The emergence of a highly transmissible lineage of *cblI*⁺ *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat. Med.* 1:661-666.
- [187] Tyler, S. D., K. R. Rozee, and W. M. Johnson. 1996. Identification of IS1356, a new insertion sequence, and its association with IS402 in epidemic strains of *Burkholderia cepacia* infecting cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 34:1610-1616.

- [188] Mahenthiralingam, E., D. A. Simpson, and D. P. Speert. 1997. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:808-816
- [189] Clode FE, Kaufmann ME, Malnick H, Pitt TL. Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and non epidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1763-6.
- [190] Liu L, Spilker T, Coenye T, LiPuma JJ. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2471-6.
- [191] LiPuma, J. J., Spilker, T., Gill, L. H., Campbell, P. W., III, Liu, L. & Mahenthiralingam, E. (2001). Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 92–96.
- [192] Manno G, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, Romano L, Giannattasio A, Chiarini L, Bevivino A. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(4):1491-7.
- [193] Martin DW, Mohr CD. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 2000 ; 68 : 24-9.
- [194] Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, Roe MH, Vandamme P, Speert D. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1999 Apr; 37(4):1004-7.
- [195] Philippon A. β -lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. *Antibiogramme*. 2ième édition. 2006. Ed ESKA. 179-183.
- [196] Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, Macdonald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(4 Pt 1):1206-12.
- [197] Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3):1073-8.
- [198] Monteil H., Harf-Monteil C. *Pseudomonas* et apparentés. *Revue Francaise des Laboratoires*, Volume 2002, Number 343, 2002, pp. 31-40(10).
- [199] Christenson JC, Welch DF, Mukwaya G, Muszynski MJ, Weaver RE, Brenner DJ. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(2):270-3.
- [200] Hoare S, Cant AJ. Chronic granulomatous disease presenting as severe sepsis due to *Burkholderia gladioli*. *Clin Infect Dis.* 1996; 23:411.
- [201] Jones AM, Stanbridge TN, Isalska BJ, Dodd ME, Webb AK. *Burkholderia gladioli*: recurrent abscesses in a patient with cystic fibrosis. *J Infect.* 2001 Jan; 42(1):69-71.

- [202] Kennedy MP, Coakley RD, Donaldson SH, Aris RM, Hohneker K, Wedd JP, Knowles MR, Gilligan PH, Yankaskas JR. *Burkholderia gladioli*: five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center. . J Cyst Fibros. 2007; 6(4):267-73.
- [203] LiPuma J J, Dulaney B J, McMenamin J D, Whitby P W, Stull T L, Coenye T, Vandamme P. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 1999; 37:3167–3170.
- [204] Clode FE, Metherell LA, Pitt TL. Nosocomial Acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999; 160(1):374-5.
- [205] Segonds C, Paute S, Chabanon G. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandora* species: interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2000;41(7):3415-8.
- [206] Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36:2748–2751.
- [207] Whitby P W, Pope L C, Carter K B, LiPuma J, Stull T L. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. J Clin Microbiol. 2000;38:282–285.
- [208] Barth AL, de Abreu E, Silva FA, Hoffmann A, Vieira MI, Zavascki AP, Ferreira AG, da Cunha LG Jr, Albano RM, de Andrade Marques E. Cystic fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil. J Clin Microbiol. 2007; 45(12):4077-80.
- [209] Visca P, Cazzola G, Petrucca A, Braggion C. Travel-associated *Burkholderia pseudomallei* infection (Melioidosis) in a patient with cystic fibrosis: a case report. Clin Infect Dis. 2001; 32(1):E15-6.
- [210] Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol. 2002; 40(6):2062-9.
- [211] Coenye T, Spilker T, Reik R, Vandamme P, Lipuma JJ, Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia species* recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3463-6.
- [212] Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found Int J Syst Evol Microbiol 54 (2004), 2285-2289.
- [213] Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ, Infection by *Ralstonia species* in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. Emerg Infect Dis. 2002; 8(7):692-6.
- [214] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choise N, Claudel-Renard C, Cunnac S, Demange N, Gaspin C, Lavie M, Moisan A, Robert C, Saurin W, Schiex T, Siguier P, Thébaud P, Whalen M, Wincker P, Levy M, Weissenbach J, Boucher CA. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature. 2002; 415(6871):497-502.

- [215] Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K, Vandamme P. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(Pt 5):1773-82.
- [216] Steinle P, Stucki G, Stettler R, Hanselmann KW. Aerobic mineralization of 2, 6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. strain RK1. Appl Environ Microbiol. 1998; 64 (7): 2566-71.
- [217] Daxboeck F, Stadler M, Assadian O, Marko E, Hirschl AM, Koller W. Characterization of clinically isolated *Ralstonia mannitolilytica* strains using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing and antimicrobial sensitivity, and comparison of the classification efficacy of phenotypic and genotypic assays. J Med Microbiol. 2005; 54(Pt 1):55-61.
- [218] Zellweger C, Bodmer T, Täuber MG, Mühlemann K. Failure of ceftriaxone in an intravenous drug user with invasive infection due to *Ralstonia pickettii*. Infection. 2004; 32(4):246-8.
- [219] Labarca JA, Trick WE, Peterson CL, Carson LA, Holt SC, Arduino MJ, Meylan M, Mascola L, Jarvis WR. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. Clin Infect Dis. 1999; 29(5):1281-6.
- [220] Yoneyama A, Yano H, Hitomi S, Okuzumi K, Suzuki R, Kimura S. *Ralstonia pickettii* colonization of patients in an obstetric ward caused by a contaminated irrigation system. J Hosp Infect. 2000; 46(1):79-80.
- [221] Riley PS, Weaver RE. Recognition of *Pseudomonas pickettii* in the clinical laboratory: biochemical characterization of 62 strains. J Clin Microbiol. 1975; 1(1):61-4.
- [222] Lacey S, Want SV. *Pseudomonas pickettii* infections in a paediatric oncology unit. J Hosp Infect. 1991; 17(1):45-51.
- [223] Fernández C, Wilhelmi I, Andradás E, Gaspar C, Gomez J, Romero J, Mariano JA, Corral O, Rubio M, Elviro J, Fereres J. Nosocomial outbreak of *Burkholderia pickettii* infection due to a manufactured intravenous product used in three hospitals. Clin Infect Dis. 1996; 22(6):1092-5.
- [224] McNeil MM, Solomon SL, Anderson RL, Davis BJ, Spengler RF, Reisberg BE, Thornsberry C, Martone WJ. Nosocomial *Pseudomonas pickettii* colonization associated with a contaminated respiratory therapy solution in a special care nursery. J Clin Microbiol. 1985; 22(6):903-7.
- [225] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial *Ralstonia pickettii* colonization associated with intrinsically contaminated saline solution--Los Angeles, California, 1998. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1998; 47(14):285-6.
- [226] Verschraegen G, Claeys G, Meeus G, Delanghe M. *Pseudomonas pickettii* as a cause of pseudobacteremia. J Clin Microbiol. 1985; 21(2):278-9.
- [227] Boutros N, Gonullu N, Casetta A, Guibert M, Ingrand D, Lebrun L. *Ralstonia pickettii* traced in blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2002; 40(7):2666-7.
- [228] De Baere T, Steyaert S, Wauters G, Des Vos P, Goris J, Coenye T, Suyama T, Verschraegen G, Vanechoutte M. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3'*thomasi*' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolilytica* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(Pt 2):547-58.

- [229] Costas M, Holmes B, Sloss LL, Heard S. Investigation of a pseudo-outbreak of '*Pseudomonas thomasi*' in a special-care baby unit by numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns. *Epidemiol Infect.* 1990; 105(1):127-37.
- [230] Vanechoutte M, De Baere T, Wauters G, Steyaert S, Claeys G, Vogelaers D, Verschraegen G. One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(12):4588-90.
- [231] Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JR, Kersters K, Vandamme P. Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49 Pt 2:405-13.
- [232] Vandamme P, Goris J, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Kersters K, De Vos P, Falsen E. Assignment of Centers for Disease Control group IVc-2 to the genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49 Pt 2:663-9.
- [233] Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10):3793-7.
- [234] Coenye T, Goris J, De Vos P, Vandamme P, LiPuma JJ. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Jul; 53(Pt 4):1075-80.
- [235] Philippon A. β -lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. In: Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. *Antibiogramme*. 2ième edition. 2006. Ed ESKA. p186.
- [236] Coenye T, Falsen E, Hoste B, Ohlén M, Goris J, Govan JR, Gillis M, Vandamme P. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50 Pt 2:887-99.
- [237] Daneshvar MI, Hollis DG, Steigerwalt AG, Whitney AM, Spangler L, Douglas MP, Jordan JG, MacGregor JP, Hill BC, Tenover FC, Brenner DJ, Weyant RS. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(5):1819-26.
- [238] Johnson LN, Han JY, Moskowitz SM, Burns JL, Qin X, Englund JA. *Pandoraea* bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23(9):881-2.
- [239] Moore J E, Coenye T, Vandamme P, Elborn J S. First report of *Pandoraea norimbergensis* isolated from food—potential clinical significance. *Food Microbiol.* 2001; 18:113–114.
- [240] Jørgensen IM, Johansen HK, Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Vandamme P, Høiby N, Koch C. Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2003; 36(5):439-46.
- [241] Vonberg RP, Gastmeier P. Isolation of infectious cystic fibrosis patients: results of a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005 (4):401-9.
- [242] Atkinson RM, Lipuma JJ, Rosenbluth DB, Dunne WM Jr. Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):833-6.

- [243] Caraher E, Collins J, Herbert G, Murphy PG, Gallagher CG, Crowe MJ, Callaghan M, McClean S. Evaluation of in vitro virulence characteristics of the genus *Pandoraea* in lung epithelial cells. *J Med Microbiol.* 2008; 57(Pt 1):15-20.
- [244] Coenye T, Liu L, Vandamme P, LiPuma JJ. Identification of *Pandoraea species* by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(12):4452-5.
- [245] Segonds C, Paute S, Chabanon G. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandoraea* species: interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3415-8.
- [246] Coenye T, LiPuma JJ. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea species*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 208(1):15-9.
- [247] Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4):1330-5.
- [248] Chiron R, Marchandin H, Counil F, Jumas-Bilak E, Freydière AM, Bellon G, Husson MO, Turck D, Brémont F, Chabanon G, Segonds C. Clinical and microbiological features of *Inquilinus sp.* isolates from five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):3938-43.
- [249] Schmoldt S, Latzin P, Heesemann J, Griese M, Imhof A, Hogardt M. Clonal analysis of *Inquilinus limosus* isolates from six cystic fibrosis patients and specific serum antibody response. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 10):1425-33.
- [250] Wellinghausen N, Essig A, Sommerburg O. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(3):457-9.
- [251] Vandamme P, Bernardet JF, Sergers P, Kersters K, Holmes B. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium gen. nov.*, *Bergeyella gen. nov.*, *Empedobacter nom. rev.* *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:827-31.
- [252] Herzog P., Winkler I., Wolking D., Kämpfer P. and Lipski A. *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *Chryseobacterium gambrini* sp. nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. 58: 26-33.
- [253] Li Y., Kawamura Y., Fujiwara N., Naka T., Liu H., Huang X., Kobayashi K. and Ezaki T. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003; 26: 523-528.
- [254] Kim K.K., Kim M.K., Lim J.H., Park H.Y. et Lee S.T. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia gen. nov.* as *Elizabethkingia meningoseptica comb. nov.* and *Elizabethkingia miricola comb. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005; 55: 1287-1293.
- [255] Lambiase A, Del Pezzo M, Raia V, Sepe A, Ferri P, Rossano F. *Chryseobacterium* respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *J Infect.* 2007; 55(6):518-23.
- [256] Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium spp.*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *J Clin Microbiol* 2004;42:445-8.
- [257] Paschoal IA, de Oliveira Villalba W, Bertuzzo CS, Cerqueira EM, Pereira MC. Cystic fibrosis in adults. *Lung.* 2007; 185(2):81-7.

- [258] Funke G, Hess T, von Graevenitz A, Vandamme P. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(4):966-9. Review.
- [259] Wallet F, Perez T, Armand S, Wallaert B, Courcol RJ. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6):2300-1.
- [260] Pneumologie et infectiologie-Texte des recommandations. In : In : Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Conférence de consensus. Paris. Novembre 2002.
- [261] Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia species* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(7):2201-8.
- [262] Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatif non fermentants isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. [Phenotypic and genotypic characteristics of non fermenting atypical strains recovered from cystic fibrosis patients]. *Pathol Biol (Paris).* 2003; 51(7):405-11.
- [263] van Pelt C, Verduin CM, Goessens WH, Vos MC, Tümmler B, Segonds C, Reubsaet F, Verbrugh H, van Belkum A. Identification of *Burkholderia spp.* in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(7):2158-64
- [264] Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, Miller S, Hughes D, King N, Gilligan PH. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(4):886-91.
- [265] Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(8):3112-5.
- [266] Moissenet D, Bingen E, Arlet G, Vu-Thien H. Mucoviscidose : identification des bacilles isolés d'infections bronchiques par séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S. [Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of "Pseudomonas-like" isolates from sputum of patients with cystic fibrosis] *Pathol Biol (Paris).* 2005; 53(8-9):500-2.
- [267] Wellinghausen N, Köthe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):4070-5.
- [268] Brisse S, Stefani S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(5):1743-8.
- [269] Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(10): 3739-45.

- [270] Hummel A, Unger G. [Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bronchial and tracheal aspirates by PCR by amplification of the exotoxin A gene] Zentralbl Hyg Umweltmed. 1998; 201(4-5): 349-55.
- [271] Laguerre G, Rigottier-Gois L, Lemanceau P. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. Mol Ecol. 1994;3(5): 479-87.
- [272] Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. J Clin Microbiol. 1999; 37 (7): 2201-8.
- [273] Robinson A, McCarter YS, Tetreault J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system, and Vitek AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 1995; 33 (2): 364-70.
- [274] Bourbeau PP, Heiter BJ. Comparison of Vitek GNI and GNI+ cards for identification of gram-negative bacteria. J Clin Microbiol. 1998; 36(9): 2775-7.
- [275] Sung LL, Yang DI, Hung CC, Ho HT. Evaluation of autoSCAN-W/A and the Vitek GNI+ AutoMicrobic system for identification of non-glucose-fermenting gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2000; 38(3): 1127-30.
- [276] Funke G, Monnet D, deBernardis C, von Graevenitz A, Freney J. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. J Clin Microbiol. 1998; 36(7): 1948-52.
- [277] Jossart MF, Courcol RJ. Evaluation of an automated system for identification of Enterobacteriaceae and nonfermenting bacilli. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18(12): 902-7.
- [278] Ling TK, Tam PC, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. J Clin Microbiol. 2001; 39(8):2964-6.
- [279] Joyanes P, del Carmen Conejo M, Martínez-Martínez L, Perea EJ. Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3247-53.
- [280] Gavin PJ, Warren JR, Obias AA, Collins SM, Peterson LR. Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21(12):869-74.
- [281] O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):2096-101.
- [282] Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Böttger EC. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2006; 44(4):1359-66.
- [283] Funke G, Funke-Kissling P. Evaluation of the new VITEK 2 card for identification of clinically relevant gram-negative rods. J Clin Microbiol. 2004; 42(9):4067-71.

- [284] Wallet F, Loïez C, Renaux E, Lemaitre N, Courcol RJ. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9):4402-6.
- [285] Renaud FN, Bergeron E, Tigaud S, Fuhrmann C, Gravagna B, Freney J. Evaluation of the new Vitek 2 GN card for the identification of gram-negative bacilli frequently encountered in clinical laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24(10):671-6.
- [286] Zbinden A, Böttger EC, Bosshard PP, Zbinden R. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(7):2270-3.
- [287] Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L. and Döbereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 86-93.
- [288] Ding L, Yokota A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54(Pt 6):2223-30.
- [289] Soares-Ramos, Juliana R.L.; Ramos, Humberto J.O.; Cruz, Leonardo M.; Chubatsu, Leda S.; Pedrosa, Fábio O.; Rigo, Liu U.; Souza, Emanuel M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 2003, vol.26, n. 4, ISSN 1415-4757.
- [290] Baldani JI, Pot B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VL, Olivares FL, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Döbereiner J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum species 3*. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46(3):802-10.
- [291] Natural Resources Inventory Center. Research overview and topics in 2001. Annual Report 2001/2002. Topic 2: Reclassification of *Pseudomonas huttiensis*, an inhabitant of rice plants. Disponible en ligne : <http://www.niaes.affrc.go.jp/annual/r2001/html/no46.html> (consulté le 5 avril 2008).
- [292] Picoli, E. A. de T., Alfenas, A. C., Gonçalves, R. C., Dias, L. L. C., Neves, D. A., Otoni, W. C., Romeiro, R. da S. Detection and antibiotic treatment of *Herbaspirillum huttiense* isolated from *in vitro* explants of *Eucalyptus* sp. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2005 (5):191-198.
- [293] Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, Savoia D, Collura A, Fiscarelli E, De Intinis G, Buseti M, Cipolloni A, d'Aprile A, Provenzano E, Collebrusco I, Frontini P, Stassi G, Trancassini M, Tovagliari D, Lavitola A, Doherty CJ, Coenye T, Govan JR, Vandamme P. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10):5136-42.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers la malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



RESUME

Au cours de la mucoviscidose, maladie génétique autosomique récessive la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne, le spectre bactérien responsable des colonisations/infections pulmonaires, autrefois étroit et représenté par la triade *S. aureus*, *H. influenzae* et *P. aeruginosa*, s'étoffe d'années en années avec l'émergence notable de diverses espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNNF) telles que *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* et *B. cepacia* et plus rarement *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea sp.*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.*, et *Chryseobacterium sp.* Dans le passé, les méthodes phénotypiques ont montré des performances moyennes dans l'identification des BGNNF issus de patients mucoviscidosiques. Ce travail a eu pour but de déterminer les performances de la carte colorimétrique VITEK 2 GN, mise sur le marché en 2004 et utilisée en routine dans notre laboratoire, pour l'identification de ces bactéries. Avec un taux d'identifications correctes de 85,1%, la carte VITEK 2 GN présente une performance d'identification des BGNNF relativement satisfaisante, étant donné les atypies que présentent les isolats de mucoviscidose. Nous avons également mis en évidence le risque de confusion de l'espèce *Herbaspirillum huttiense* avec les espèces du complexe *cepacia* par la mise en œuvre de méthodes d'identification phénotypiques (API20 NE et VITEK 2 GN). *H. huttiense*, retrouvé de façon transitoire chez les patients étudiés, ne semble pas être à l'origine d'une détérioration pulmonaire. Ce germe pourrait constituer un germe émergent dans la mucoviscidose.

TITLE

Identification of non fermenting Gram negative bacilli in cystic fibrosis : evaluation of the performances of the Vitek2 GN card (bioMérieux) and focus on the risk of misidentification of *Herbaspirillum huttiense* as *B. cepacia* complex organisms with phenotypic tests.

ABSTRACT

In cystic fibrosis (CF), which is the most common genetic autosomal recessive disease in the Caucasian population, lung infections are caused by a narrow spectrum of bacterial species, mainly *S. aureus*, *H. influenzae* and *P. aeruginosa*. However, various species of non fermenting Gram-negative bacilli (NFGNB) such as *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* and the *B. cepacia* complex (Bcc) or rarer organisms such as *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea sp.*, *Ralstonia sp.*, *Inquilinus sp.*, and *Chryseobacterium sp.* have recently emerged. In the past, phenotypic methods showed average performances for the identification of NFGNB recovered from CF patients. This work aimed at determining the performances of the VITEK 2 GN colorimetric card, which is available since 2004 and is routinely used in our laboratory, for the identification of these bacteria. The rate of correct identifications was shown to be of 85,1 %, which can be considered satisfactory, according to the fact that rods recovered from CF are sometimes atypical. We also highlighted the risk of misidentification of *Herbaspirillum huttiense* as Bcc species by the use of phenotypic methods (API20NE and VITEK 2 GN). *H. huttiense* which has been transiently recovered from the sputum of CF patients and does not seem to cause lung deterioration, could be an emergent organism in cystic fibrosis.

DISCIPLINE- SPECIALITE DOCTORALE BACTERIOLOGIE

MOTS CLES

Mucoviscidose, Bacilles à Gram négatif non fermentants, Identification, Carte VITEK 2 GN, *Herbaspirillum huttiense*.

LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE-HYGIENE

Institut fédératif de biologie, hôpital Purpan

330 Avenue de Grande-Bretagne - TSA 40031 - 31059 Toulouse cedex 9